

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Michael Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen
und Marburg GmbH, Standort Marburg

Charakterisierung Hymenopterengift-spezifischer IgG- Antikörper mit dem EliFAB Assay

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Jan Müller
aus Eschwege

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
24.10.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Pfützner

Koreferent: Prof. Dr. Bauer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Summary	VII
1 Einleitung	1
1.1 Allergische Reaktionen nach Stichen durch Hymenopteren	1
1.2 Epidemiologie der Hymenopterengiftallergie	2
1.3 Hymenopterengifte	2
1.4 Klinisches Erscheinungsbild der Hymenopterengiftallergie	4
1.5 Diagnostik	5
1.6 Therapie der Hymenopterengiftallergie	7
1.7 Pathophysiologie der allergischen Typ-I-Reaktion	8
1.8 Spezifische humorale Komponenten der allergischen Reaktion	10
1.8.1 IgE	11
1.8.2 IgG	11
1.9 Blockierende Antikörper – quantitative und qualitative Messmethoden	13
1.9.1 <i>IgE-blocking factor</i> Assay	13
1.9.2 <i>IgE-facilitated antigen binding (IgE-FAB)</i> Assay	14
2 Hintergründe der vorliegenden Arbeit	17
3 Material	19
3.1 Patientenmaterial	19
3.2 Proteinantigene	19
3.3 Chemikalien	19
3.4 Puffer und Lösungen	20
3.5 Antikörper	20
3.6 Verbrauchsartikel	20
3.7 Geräte	21
3.8 Software	22

4	Methoden.....	23
4.1	Patientenkollektive.....	23
4.1.1	Einschlusskriterien	26
4.1.2	Ausschlusskriterien	26
4.2	Allergenspezifische Immuntherapie und Studiendesign.....	27
4.3	Serologische Diagnostik.....	29
4.3.1	Zeitpunkte der Probengewinnung	29
4.3.2	IgE-, IgG- und IgG4-Konzentrationsbestimmung	29
4.3.3	Messung der Effekte blockierender Antikörper mit dem EliFAB Assay	30
4.3.3.1	Testprinzip	30
4.3.3.2	Testdurchführung	31
4.3.4	Depletion von IgG-Antikörpern.....	32
4.4	Statistik.....	33
5	Ergebnisse	35
5.1	Etablierung des EliFAB	35
5.1.1	Screening für geeignete Indikatorseren und Bestimmung der optimalen Allergenkonzentration.....	35
5.1.1.1	Bet v 1	35
5.1.1.2	Api m 1	37
5.1.1.3	Ves v 5	38
5.1.2	Validierung der allergenspezifischen Assays	39
5.1.2.1	Api m 1-EliFAB	39
5.1.2.2	Ves v 5-EliFAB	40
5.1.3	Blockierende Aktivität vor und unter allergenspezifischer Immuntherapie bei Birkenpollenallergikern.....	40
5.2	EliFAB-Messung der Patientenkollektive der Bienen- und Wespenallergiker	41
5.2.1	Blockierende Aktivität im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie	41
5.2.2	Blockierende Aktivität vor Therapie.....	43
5.2.3	Blockierende Aktivität vor und nach Stichprovokation unter allergenspezifischer Immuntherapie	44
5.2.4	Quantitative und qualitative Veränderungen der spezifischen humoralen Komponenten infolge der allergenspezifischen Immuntherapie	45
5.2.5	Stichreaktionen nach Feldstich	47

6	Diskussion.....	50
6.1	Etablierung des EliFAB Assays	50
6.2	Blockierende Aktivität von Hymenoptereingiftallergikerseren	52
6.2.1	Wie früh wirkt die Immuntherapie?.....	53
6.2.2	Blockierende Aktivität vor, unter und nach allergenspezifischer Immuntherapie – klinische Auswirkungen.....	55
6.2.3	Blockierende Aktivität als Entscheidungsparameter für die Toleranz von Stichereignissen	61
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Anhang	76
8.1	Danksagung	76
8.2	Verzeichnis akademischer Lehrer.....	77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AIT	allergenspezifische Immuntherapie
APC	engl.: <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungskluster)
d.h.	das heißt
DZ	dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	lat.: <i>et alii</i> (und andere)
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung; Durchflusszytometrie)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunde(n)
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IFNγ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
l	Liter
m	milli ($\times 10^{-3}$)
M	Molar
MD	Maximaldosis
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
n	engl.: <i>number</i> (Anzahl)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
rpm	Rotationen pro Minute

sog.	sogenannt
PT	Pricktest
SQ-Einheiten	standardisierte Qualitätseinheiten
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
U	engl.: <i>units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)

In der Arbeit verwendete englische und lateinische Begriffe sind kursiv dargestellt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abbildung 1: Pathophysiologischer Mechanismus der allergischen Typ-I-Reaktion
Abbildung 2: Schematische Darstellung des *IgE-blocking factor* Assays
Abbildung 3: Schematische Darstellung des IgE-FAB Assays

Methoden

- Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT), Entnahme von Serumproben und Überblick der Patientenkollektive
Abbildung 5: Schematische Darstellung des EliFAB-Prinzips

Ergebnisse

- Abbildung 6: Vergleich potentieller Indikatorseren im Bet v 1-spezifischen EliFAB
Abbildung 7: Vergleich von Indikatorserum und Indikatorplasma sowie optimale Allergenkonzentration im Bet v 1-spezifischen EliFAB
Abbildung 8: EliFAB-Absorptionswerte eines potentiellen Api m 1-Indikatorserums vor und nach Depletion von allergenspezifischem IgG
Abbildung 9: EliFAB-Absorptionswerte eines potentiellen Ves v 5-Indikatorserums vor und nach Depletion von allergenspezifischem IgG
Abbildung 10: Validierung der allergenspezifischen EliFAB Assays durch fünf nicht-atopische Kontrollen
Abbildung 11: Blockierende Aktivität in zwei Birkenpollenallergikerseren vor und nach allergenspezifischer Immuntherapie (AIT)
Abbildung 12: Inhibition der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen durch CD23 und allergenspezifische IgG4-Konzentration im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT)
Abbildung 13: Unterschiede in der Ausprägung blockierender Aktivität in Seren Api m 1- bzw. Ves v 5-allergischer Patienten im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT)
Abbildung 14: Ausprägung blockierender Aktivität in Seren Api m 1- bzw. Ves v 5-allergischer Patienten vor Beginn der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT)

- Abbildung 15: Inhibition CD23-gebundener IgE-Allergen-Komplexe unmittelbar vor (U7), einen Tag (U8) und 3-8 Wochen im Verlauf (U9) nach Stichprovokation
- Abbildung 16: Quantitative humorale Veränderungen unter allergenspezifischer Immuntherapie (AIT)
- Abbildung 17: Qualitative humorale Veränderungen unter allergenspezifischer Immuntherapie (AIT)
- Abbildung 18: Inhibition CD23-gebundener IgE-Allergen-Komplexe bei Toleranz und fehlender Toleranz eines Feldstichs

Tabellenverzeichnis

Einleitung

- Tabelle 1: Einteilung der systemischen allergischen Reaktion nach Ring und Messmer
- Tabelle 2: Einteilung allergenspezifischer IgE-Konzentrationen in CAP-Klassen

Methoden

- Tabelle 3: Übersicht der gebildeten Patientenkollektive
- Tabelle 4: Dosierungsschema des Ultra Rush-Protokolls

Ergebnisse

- Tabelle 5: Api m 1-spezifische Antikörperkonzentrationen vor und nach Depletion von IgG
- Tabelle 6: Ves v 5-spezifische Antikörperkonzentrationen vor und nach Depletion von IgG
- Tabelle 7: Allergenspezifische Antikörperkonzentrationen des Kollektivs „Feldstich“
- Tabelle 8: Patientenangaben zu Stichreaktionen bei Feldstichen nach abgeschlossener allergenspezifischer Immuntherapie

Zusammenfassung

Insektenstiche durch Mitglieder der Ordnung der Hymenopteren sind ein häufiges und oft unterschätztes Ereignis. In epidemiologischen Studien berichteten 0,3-3,4% der Befragten von nach Hymenopterenstichen erlebten systemischen Reaktionen, die lebensgefährliche Folgen haben können. Nach der Identifikation des verantwortlichen Allergens steht mit der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT) eine kausale, sichere und effektive Therapiemöglichkeit zur Verfügung. Während die hohe klinische Wirksamkeit der AIT in zahlreichen Studien belegt werden konnte, sind die der Behandlung zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen bisher noch nicht ausreichend geklärt. Die hohe Bedeutung der Aufklärung dieser Mechanismen zeigt sich insbesondere darin, dass bisher kein aussagekräftiger immunologischer Erfolgsparameter der Therapie existiert. In diesem Zusammenhang haben das allergenspezifische IgG und insbesondere die Subklasse IgG4 viel Beachtung erfahren. Die Konzentrationen dieser sog. blockierenden Antikörper (AK) steigen während der Therapie im Serum von Patienten an und werden mit dem Erfolg der AIT verbunden. Dabei wird davon ausgegangen, dass allergenspezifische IgG-AK in Konkurrenz zu Mastzell-gebundenen IgE-AK treten und die Komplexbildung dieser mit dem Allergen sowie die darauffolgende Aktivierung von Effektorzellen verhindern können. Allerdings konnte in zahlreichen Studien keine Korrelation zwischen der Höhe der Immunglobulinkonzentrationen und dem klinischen Erfolg der AIT gefunden werden.

Größere klinische Relevanz versprechen an dieser Stelle Verfahren, die eine qualitative Veränderung der blockierenden AK und der damit verbundenen Effekte erfassbar machen. Aktuelle Untersuchungen bei Graspollenallergikern zeigen eine deutlich bessere Korrelation von klinischer Wirksamkeit und den Ergebnissen dieser Messverfahren. Die Messungen wurden mit dem sog. *IgE-facilitated antigen binding* Assay durchgeführt, in dem der Einfluss von blockierenden AK auf die Bindung von Allergen-IgE-Komplexen durch B-Zellen erfasst wird. Kürzlich wurde eine zellfreie Variante dieses Assays publiziert. Der sog. *enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding* (EliFAB) Assay basiert auf den Grundlagen des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und ist somit weniger fehleranfällig, zeit- und kostenaufwendig. Dieses Verfahren wurde innerhalb dieser Arbeit für das jeweilig häufigste Majorallergen des Bienen- bzw. Wespengiftes etabliert mit dem Ziel, die klinische Bedeutung der unter AIT gebildeten blockierenden Aktivität durch IgG-AK einschätzen zu können.

In der Folge konnte die blockierende Aktivität in Patientenseren vor, unter und bis zu zwölf Jahre nach Ende einer AIT mit Hymenoptergift bestimmt werden. Zur Prüfung der klinischen Relevanz wurden diese Daten mit dem Ergebnis einer Stichprovokation

während der Therapie sowie mit den Berichten bei Feldstichen nach Therapie verglichen.

Während der Einleitungsphase einer Ultra Rush AIT stieg die blockierende Aktivität in Patientenseren parallel zu den Konzentrationen von IgG4-AK an. Dieser Effekt wurde nach frühestens acht Tagen beobachtet. Alle Patienten tolerierten die im Verlauf der Therapie durchgeführte Stichprovokation. Damit einhergehend konnte in nahezu allen Patientenseren eine Allergen-blockierende Aktivität nachgewiesen werden, sodass von einer hohen Korrelation zwischen dieser und klinischer Wirksamkeit während der Therapie auszugehen ist. Inwiefern die Messung Allergen-blockierender Aktivität eine Stichprovokation ersetzen kann, müssen weitere Untersuchungen klären.

Die unter Therapie ausgebildete hohe blockierende Aktivität konnte in durchschnittlich neun Jahre nach Ende der Therapie gewonnenen Seren nicht nachgewiesen werden. So war die blockierende Aktivität im Median zwar noch stärker als in der nicht AIT-behandelten Gruppe, es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Gleichzeitig zeigen klinische Nachbeobachtungsstudien, dass auch mehr als 12 Jahre nach Ende der AIT mindestens 80 % der Patienten vor einer Stichreaktion geschützt sind. Die Ausbildung blockierender Aktivität scheint folglich zumindest für einen großen Teil der Patienten zwar einen wichtigen, aber nicht den einzigen oder unverzichtbaren immunologischen Mechanismus einer langanhaltenden Toleranz gegenüber Stichereignissen darzustellen.

Die gleichen Nachbeobachtungsstudien legen jedoch auch nahe, dass einzelne Patienten den erworbenen Schutz bereits kurz nach Therapieende verlieren. Da eine dauerhaft fortgeführte Immuntherapie mit einem anhaltenden Schutz assoziiert ist und die Ausdehnung von Injektionsintervallen auf möglicherweise bis zu sechs Monate gleiche Sicherheit und Effektivität zeigt, sollte das Konzept von Booster-Injektionen im Sinne einer ausgedehnten Erhaltungstherapie bei Risiko-Patienten erneut erörtert werden. Neben bereits bekannten Risikofaktoren könnte an dieser Stelle auch die Messung blockierender Aktivität zur Identifikation solcher Patienten beitragen.

Summary

Stings by insects of the order Hymenoptera represent a common and often underestimated event in every day life. Epidemiological studies reveal that 0,3-3,4 % of people being stung by Hymenoptera develop a systemic reaction and thereby a potentially life-threatening incident.

In case of the diagnosis of a Hymenoptera venom allergy the allergen-specific immunotherapy (AIT) offers a safe and effective treatment. While numerous studies have proven the success of this therapy, underlying immunological mechanisms are not yet completely understood. The importance of understanding these mechanisms becomes evident since no parameter exists to measure the efficacy of AIT so far. At this point IgG antibodies and its subclass IgG4 have gained high attention. Concentrations of these so-called blocking antibodies rise during therapy and are considered as indicators of an effective treatment. In theory, allergen-specific IgG antibodies compete with mast cell-bound IgE antibodies for binding allergen and thus inhibit the activation of effector cells. Nevertheless, studies could not show a correlation between allergen-specific IgG antibody concentrations and clinical success of AIT.

Of more clinical relevance are methods which detect qualitative changes of the blocking effect of these antibodies. Studies on pollen-allergic patients show a significant higher correlation between clinical improvement and the results of measuring blocking activity. These data were obtained using the so-called IgE facilitated antigen binding assay which determines the influence of blocking antibodies on the binding of allergen-IgE-complexes by B cells. Recently, a cell-free modification of this assay was published. The so-called enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding (EliFAB) assay is based on the ELISA method and therefore less expensive, time-consuming and prone to errors. In this study the assay was established for the most frequent major allergens of bee and wasp venom in order to assess the blocking effects of IgG antibodies induced during AIT.

Subsequently, serum samples could be measured which had been drawn within the ultra-rush initiation phase of AIT with Hymenoptera venom. Furthermore, blocking activity in patients sera was quantified before, under and up to 12 years after the end of therapy. These data could be compared to the results of sting challenges during therapy and field stings after finishing AIT.

Within the initiation phase blocking activity rose in parallel to the concentration of IgG4 antibodies and was observed earliest after 8 days. All patients tolerated a sting challenge during therapy accompanied by an increase of blocking activity in nearly all sera. These data imply a high correlation of clinical success of AIT and blocking activity in

patients' sera. Future studies need to focus on the question whether the detection of blocking activity during therapy may replace a sting challenge.

In contrast to the observations under therapy serum samples taken from patients an average of nine years after AIT did not show an increased blocking activity. Even though the median blocking activity was still higher than in untreated patients, no statistical significant change could be observed. In contrast clinical studies collecting data on field stings up to 12 years after the end of therapy reveal a high protection against a systemic reaction of more than 80 %. Thus, for the majority of the patients the expression of blocking activity seems to be an important, but not an indispensable immunological mechanism of prolonged tolerance to stings. However, those clinical data reveal that individual patients loose the therapy-induced protection shortly after the end of AIT. Since the continuation of AIT is associated with long-lasting clinical efficacy and moreover the elongation of injection intervals for probably up to six months shows an equal safety and efficacy, the concept of booster injections in terms of a prolonged maintenance therapy for high-risk patients should be brought back into discussion. Besides known risk factors the assessment of serum blocking activity could represent a tool for the identification of those patients.

1 Einleitung

Permanent befasst sich das menschliche Immunsystem mit der Unterscheidung von pathogenen und ungefährlichen Fremdkörpern. Diese vom Immunsystem erfassbaren körperfremden Moleküle werden als Antigene bezeichnet. Für den Allergiker wird ein von gesunden Personen toleriertes nicht-pathogenes Antigen zum nicht tolerierten sog. Allergen. Dieses kann über das Immunsystem bereits in kleinsten Mengen eine Überempfindlichkeitsreaktion auslösen.

Dabei treten in Abhängigkeit von der Art des Allergens, der Art der allergischen Reaktion und des jeweiligen Kontaktorgans unterschiedliche Symptome auf. Auf Allergenkontakt folgende lokal begrenzte Reaktionen stellen beispielsweise Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma bronchiale, gastrointestinale Beschwerden und Ekzeme dar. Systemische Reaktionen auf das Allergen zeigen sich durch generalisierte Urtikaria und Herz-Kreislauf-Beschwerden bis hin zur Bewusstlosigkeit und Herzstillstand. Natürlich können lokale und systemische Symptomatik miteinander einhergehen.

Während sich eine Pollenallergie zumeist nur in lokal begrenzten Symptomen der Atemwegsorgane äußert, stellt die Allergie gegenüber Hymenopterengiften (z.B. Biene, Wespe) eine Systemerkrankung mit entsprechenden generalisierten Reaktionen dar. So kann ein Stich durch ein Insekt der Ordnung der Hymenopteren schnell einen dramatischen und lebensgefährlichen Verlauf nehmen. Eine umfangreiche Diagnostik und ursächliche Behandlung der Hymenopterengiftallergie ist damit unerlässlich.

1.1 Allergische Reaktionen nach Stichen durch Hymenopteren

Der Stich zahlreicher Insekten löst beim Menschen lokale Haut- und Gewebsreaktionen aus. Verantwortlich dafür sind im injizierten Gift enthaltene toxische Substanzen, die eine massive Zellschädigung verursachen. Intensivmedizinisch relevant wird ein Stichereignis jedoch erst mit einer systemischen Reaktion, der ein allergischer Mechanismus zugrunde liegt.

In Mitteleuropa treten solche allergischen Reaktionen vor allem nach Stichereignissen durch Mitglieder der Familie der Apidae (Bienen) und Vespidae (Faltenwespen) auf. Typische Vertreter der Familie der Apidae sind dabei die Honigbiene *Apis mellifera* (im Folgenden: Biene) und das Genus der Hummeln (*Bombus*). Zusammen mit den Vertretern der Vespidae (im Folgenden: Wespen) wie z.B. der überall in Europa sowie weiten Teilen Asiens verbreiteten *Vespula germanica* oder der *Vespula vulgaris* gehören sie zur Ordnung der sog. Hautflügler oder Hymenopteren (Przybilla und Ruëff 2010).

1.2 Epidemiologie der Hymenopterengiftallergie

Allergien stellen schon seit einiger Zeit eine immer stärker wahrnehmbare Thematik in der Gesellschaft dar. Epidemiologische Studien verzeichnen deutlich steigende Prävalenzen allergischer Erkrankungen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts (Howarth und Holmberg 1995). Inzwischen sind weltweit nahezu endemische Ausmaße erreicht. So zeigen Pricktests (PT) während der dritten Stufe der *National Health And Nutrition Examination Survey*, dass 54,3 % der US-Bevölkerung eine Sensibilisierung gegenüber einem oder mehreren Allergenen aufweisen (Arbes et al. 2005). Da es sich um eine auf zehn Hauptallergene limitierte Studie handelt, dürfte die wahre Prävalenz sogar noch unterschätzt sein. Insbesondere Pollenallergien besitzen einen hohen Stellenwert in der Gesellschaft. Symptome in der Pollensaison sind allgegenwärtig, der Umgang mit der auch als Volkskrankheit bezeichneten Pollinosis bekannt.

Doch auch Insektenstiche sind ein relativ häufiges und oft unterschätztes Ereignis im gemäßigten Klima Mitteleuropas. Zwischen 57 bis 94,5 % der erwachsenen Bevölkerung (Studien aus Italien, Frankreich und der Türkei) berichten von erlebten Stichen der Ordnung der Hymenopteren (Aust et al. 2010). Dabei erleiden 0,3-3,4 % der Befragten nach eigener Aussage eine systemische anaphylaktische Reaktion, am seltensten tritt diese bei Kindern, am häufigsten bei Imkern auf (Spillner et al. 2014). Aufgrund dieser vermeintlich niedrigen Auftretenswahrscheinlichkeit einer Anaphylaxie gelten Hymenopterengiftallergien in der Bevölkerung als selten und werden weitgehend nicht ausreichend diagnostiziert und therapiert. Welche schweren Folgen dieses Defizit hat, wird an Zahlen des Statistischen Bundesamtes deutlich: In den letzten zehn Jahren wurden in Deutschland jährlich 10-32 Todesfälle infolge von Stichreaktionen registriert (Aust et al. 2010). Die Dunkelziffer dürfte deutlich höher liegen. Daten, die aus Krankenhauseinweisungen, Notaufnahmebesuchen und einem nationalen Register für anaphylaktische Reaktionen extrapoliert wurden, zeigen, dass die Hälfte aller anaphylaktischen Reaktionen eine Folge von Hymenopterengiftallergien sind (Worm et al. 2014).

1.3 Hymenopterengifte

Hymenopterengifte bestehen aus einer Vielzahl von Substanzen, zu denen neben niedermolekularen Verbindungen vor allem auch höhermolekulare Peptide und Proteine zählen, von welchen viele enzymatische Eigenschaften aufweisen (Przybilla und Ruëff 2010). Peptide und Phospholipasen sind dabei verantwortlich für zyto- und neurotoxische Effekte, die sich klinisch in der lokalen Stichreaktion und Schmerz äußern. Um das Eindringen dieser in tiefere Gewebeschichten zu ermöglichen, wirken Hyaluroni-

dasen und biogene Amine als sog. *spreading factor*. Diese höhermolekularen Peptide und Proteine nehmen auch immunologisch eine besondere Stellung ein, da sie die Hauptursache allergischer Sensibilisierungen sind.

Bei der Identifizierung von Allergenen wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden. Gegen Majorallergene weisen mehr als 50 % der Patienten allergenspezifische Immunglobulin (Ig)E-Antikörper (AK) auf, gegen Minorallergene entsprechend weniger als 50 %. Im Gift der Honigbiene wurde dabei eine Reihe von Majorallergenen anhand von spezifischen IgE-AK gegen rekombinant hergestellte Allergene identifiziert. Bei bis zu 80 % der Patienten und damit am häufigsten lässt sich eine Sensibilisierung gegenüber der Phospholipase A₂ (PLA₂, Api m 1) finden (Köhler et al. 2014). Definitionsgemäß weitere als Majorallergene einzustufende Bestandteile des Bienengifts stellen die saure Phosphatase (Api m 3), Dipeptidylpeptidasehomolog (Api m 5) sowie Icarabin (Api m 10) dar. Die Majorallergene im Wespengift sind ebenfalls eine Phospholipase (PLA₁, Ves v 1) und das sog. Antigen 5 (Ves v 5; Biló et al. 2005). Dabei weisen etwa 90 % der Wespengiftallergiker spezifische IgE-AK gegen Ves v 5 auf (Hofmann et al. 2011a, Hofmann et al. 2011b, Vos et al. 2013).

Bei Hymenopterengiften spielt Kreuzreaktivität eine erhebliche Rolle in Diagnostik und Therapie. Die PLA₂ der Hummel entspricht zu 54 % der der Honigbiene, sodass Patienten eine gleichzeitige Sensibilisierung gegenüber beiden Giften zeigen können (Bucher et al. 2001). Des Weiteren weist ein Minorallergen der Honigbiene, die Hyaluronidase (Api m 2), etwa 53 % Sequenzgleichheit mit dem verwandten Enzym der Wespe (Ves v 2) auf (King et al. 1996). Die Hyaluronidase, gegenüber der immerhin etwa 47 % der Bienengiftallergiker sensibilisiert sind (Köhler et al. 2014), wurde so auch als Hauptkomponente von Kreuzreaktionen zwischen den beiden Arten identifiziert (Straumann et al. 2000).

Eine weitere Ursache von Kreuzreaktivität und falsch positiven Tests mit dem diagnostischen Ergebnis der Mehrfachsensibilisierung stellen *cross-reacting carbohydrate determinants* (CCD) dar. Diese kommen als Epitope auf Glykoproteinen der Giftbestandteile vor, sind zwischen den Hymenopterenarten oft gleich und lösen ebenfalls die Produktion spezifischer IgE-AK aus (Erzen et al. 2009). Da die Epitope in der Regel aber so klein sind, dass es zu keiner IgE-Quervernetzung kommt, dominiert die Ansicht, dass nur diagnostische, aber keine klinische Relevanz besteht (van der Veen et al. 1997).

Die Unterscheidung von Kreuzreaktionen und tatsächlichen Mehrfachsensibilisierungen ist entscheidend für die Wahl der Präparate bei der Immuntherapie, da nur Allergene, gegen die eine tatsächliche Sensibilisierung und keine Kreuzreaktion besteht, in der Therapie zum Einsatz kommen sollten (Biló et al. 2005). Insbesondere rekombinant

hergestellte Giftbestandteile mit zum Teil entfernten CCD bieten in Zukunft die Möglichkeit einer exakten Diagnose und daraus resultierenden Therapie (de Graaf et al. 2009, Seismann et al. 2010).

1.4 Klinisches Erscheinungsbild der Hymenopterengiftallergie

Das klinische Erscheinungsbild nach Hymenopterenstichen ist vielfältig. Als normale Hautreaktion gilt eine lokale, schmerzhaft, teils juckende Quaddelbildung von bis zu ca. 2 cm Durchmesser (Biló et al. 2005). Je nach Eindringtiefe und injizierter Giftmenge kann diese auch größer ausfallen. In der Regel bildet sich die Schwellung innerhalb einiger Stunden zurück, sodass sie als Reaktion auf die zyto- und neurotoxische Wirkung des Giftes beurteilt werden kann. Überschreitet die Schwellung um die Einstichsstelle jedoch einen Durchmesser von 10 cm und persistiert für mehr als 24 Stunden, liegt eine übersteigerte Lokalreaktion vor (Biló et al. 2005). Diese kann gelegentlich eine ganze Extremität betreffen und über Tage bis Wochen andauern.

Von den übersteigerten Lokalreaktionen zu differenzieren sind generalisierte systemische allergische Reaktionen. Je nach beteiligtem Organsystem und dem Ausmaß der Reaktion lassen sich vier Schweregrade unterscheiden (Tabelle 1). Mit einem Wiederholungsrisiko von ca. 74 % bei Erwachsenen und 40 % bei Kindern (Reisman 1992) erfordert ein solches Ereignis eine umfassende Abklärung der Sensibilisierung und gegebenenfalls die Indikationsstellung einer allergenspezifischen Immuntherapie (AIT).

Tabelle 1: Einteilung der systemischen allergischen Reaktion nach Ring und Messmer (modifiziert nach Worm et al. 2014).

Grad	Haut	Abdomen	Respirationstrakt	Herz-Kreislauf
I	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem			
II	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Nausea Krämpfe	Rhinorrhoe Heiserkeit Dyspnoe Arrhythmie	Tachykardie (Anstieg ≥ 20 /min) Hypotonie (Abfall ≥ 20 mmHg systolisch)
III	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Larynxödem Bronchospasmus Zyanose	Schock
IV	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	Erbrechen Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

1.5 Diagnostik

An erster Stelle der Diagnostik steht eine ausführliche Anamnese, bei der die genauen Umstände des Stichereignisses erfragt werden, um möglichst sicher das die Reaktion verursachende Insekt zu identifizieren. Bei den sich anschließenden diagnostischen Testungen kann zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Verfahren unterschieden werden, von denen hier exemplarisch die wichtigsten erläutert werden.

Der am häufigsten eingesetzte *in vivo*-Test ist der PT, der nicht nur für die Insektengift-diagnostik, sondern auch zum Nachweis einer klinisch relevanten Sensibilisierung gegenüber Inhalationsallergenen, Nahrungsmitteln, Medikamenten und einigen Chemikalien herangezogen wird (Bernstein et al. 2008). Tropfenweise werden Allergenkonzen-trate auf die verdeckte (innere) Seite des Unterarms aufgetragen und mittels eines Lanzettenstichs die Penetration in die Epidermis ermöglicht. Zur korrekten Interpretati-on müssen als Positivkontrolle Histamin und als Negativkontrolle Natriumchloridlösung mitgeführt werden. Nach 15-20 min werden der maximale Durchmesser der entstan-denen Quaddeln (und ggf. Erytheme) dokumentiert und mit der Positiv- bzw. Negativ-kontrolle verglichen. Als positiv gilt dabei ein Quaddeldurchmesser von mindestens 3 mm.

Intrakutane Tests, die sensitiver (aber oft auch unspezifischer) sind als der PT, eignen sich insbesondere zur Evaluation einer Anaphylaxie bei Insektengift- und auch Medikamentenallergien (Bernstein et al. 2008). Zeigen PT trotz positiver Expositionsanamnese ein negatives Resultat, können durch einen Intrakutantest klinisch relevante Reaktionen nachgewiesen werden. Es werden geringe Volumina (ca. 0,02-0,05 ml) des Allergens ebenfalls am volaren Unterarm intradermal mit einer Spritze injiziert, wobei die Startkonzentration im Vergleich zur verwendeten Konzentration beim PT 100-1000-fach verdünnt wird. Der Intrakutantest kann 10-15 min nach Injektion wie der PT durch Bestimmung von Quaddel- (und ggf. Erythem-)durchmesser ausgewertet werden. Als positiv gilt ein Quaddeldurchmesser von mindestens 5 mm.

Antihistaminika und trizyklische Antidepressiva können zu einer Verfälschung der Ergebnisse von *in vivo*-Tests führen und sollten idealerweise für einige Tage abgesetzt werden (Bernstein et al. 2008).

Als weiterer Diagnostikschritt kann die *in vitro*-Bestimmung allergenspezifischer IgE-AK herangezogen werden (Bernstein et al. 2008). Isoliert erhöhte Plasmaspiegel spezifischer IgE-AK beweisen keine klinisch relevante Allergie, zeigen jedoch allgemein eine Sensibilisierung gegenüber dem getesteten Allergen auf.

Um eine einfachere Interpretation im Sinne der klinischen Relevanz zu ermöglichen, erfolgt die Einordnung der gemessenen IgE-Werte in Klassen. Das inzwischen fest etablierte ImmunoCap-Messsystem ist dabei durch sechs mögliche Klassen charakterisiert (Tabelle 2).

Bei der Diagnostik der Hypersensibilität nach einer allergischen Stichreaktion stellt sich nicht selten das Problem dar, dass das entsprechende Insekt nicht sicher identifiziert werden kann. Daher empfiehlt sich ein Test auf alle in Frage kommenden Hymenopterenengifte (Brown und Tankersley 2011).

Tabelle 2: Einteilung allergenspezifischer IgE-Konzentrationen in CAP-Klassen (nach Allergiediagnostik mit ImmunoCap, Thermo Fisher 2012).

Konzentration an spezifischem IgE (kUA/l)	CAP-Klasse	Beurteilung
0,10 – 0,35	0	negativ
0,35 – 0,70	1	grenzwertig positiv
0,70 – 3,50	2	schwach positiv
3,50 – 17,5	3	positiv
17,5 – 50,0	4	stark positiv
50,0 – 100	5	sehr stark positiv
> 100	6	sehr stark positiv

1.6 Therapie der Hymenopterengiftallergie

Die Erfahrung einer anaphylaktischen Reaktion schürt in Patienten nicht nur die Angst vor einer erneuten Situation der Hilflosigkeit und Abhängigkeit bei einem weiteren Sticheignis, sie stellt nicht selten auch eine vitale Bedrohung dar. Aus diesem Grund umfasst die Therapie der Insektengiftallergie immer die Ausstattung des Patienten mit einem Notfallset sowie eine umfassende Beratung. Das Notfallset beinhaltet in der Regel ein rasch wirksames orales Antihistaminikum (z.B. als Tropfenlösung), ein ebenfalls zur oralen Einnahme geeignetes Glukokortikosteroid sowie ein Adrenalinpräparat.

Die einzige kausale Therapie stellt eine Toleranzinduktion mittels AIT dar. Der Erfolg einer AIT bei Insektengiftallergikern konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Golden et al. 2011). Dabei hat sich gezeigt, dass 80-90 % der Bienengiftallergiker nach erfolgter Therapie bei einem erneuten Stich vor systemischen Reaktionen geschützt sind (Müller 2003). Bei Wespengiftallergikern liegt die Erfolgsquote sogar bei 95 % (Müller 2003).

Der Ablauf der AIT kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der Einleitungsphase wird die Dosis des subkutan injizierten Allergenpräparats schrittweise gesteigert. Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Injektionen betragen Stunden (Ultra Rush oder Rush Schema) bis eine Woche (konventionelles Schema). Nach Erreichen der Zieldosis wird diese in der Erhaltungsphase in der Regel in ein-monatlichen Abständen über 3-5 Jahre verabreicht (Aust et al. 2010).

1.7 Pathophysiologie der allergischen Typ-I-Reaktion

Allergische Reaktionen treten klinisch unterschiedlich in Erscheinung, was zur Einteilung in vier Typen durch Coombs und Gell führte (Coombs und Gell 1975). Diese berücksichtigt die der Überempfindlichkeitsreaktion zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen und unterscheidet drei AK-vermittelte Reaktionen von einer zellulären Immunantwort. Die Reaktion gegenüber Hymenopterengiften ist auf eine IgE-AK-vermittelte Reaktion vom Typ I zurückzuführen. Daher wird der ihr zugrunde liegende Mechanismus im Folgenden detailliert beschrieben.

Bei der Entwicklung einer Allergie des Soforttyps kommt es zunächst zu einer Sensibilisierungsphase. Dabei ist die Produktion von IgE-AK gegen harmlose Umweltantigene wie Pollen, Nahrungsmittel, Insektengifte, Hausstaubmilben und Tierepithelien entscheidend. Die beim Erstkontakt über Haut oder Schleimhäute in den Körper gelangten Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) wie dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), B-Zellen oder Monozyten aufgenommen. In Lysosomen dieser Zellen werden die Allergenmoleküle enzymatisch gespalten, sodass einzelne Peptide entstehen, die über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-II auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Hahn et al. 2008). Naive T-Zellen, sog. T-Helfer (Th)0-Zellen, können mittels ihres T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor*, TCR) die präsentierten Peptide binden und differenzieren sich in Gegenwart von Interleukin (IL)-4 zu allergenspezifischen Th2-Zellen (Romagnani 2004). Diese leiten über die Produktion von IL-4 und IL-13 den Klassenwechsel IgM-produzierender B-Zellen zu IgE ein (Nies et al. 2002, Romagnani 2004). Rückwirkend wird durch IL-4 die Oberflächenexpression von MHC-II erhöht (Estes et al. 1995; Abb. 1).

Die produzierten IgE-AK binden in der Folge an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie an niedrigaffine IgE-Rezeptoren (FcεRII, *cluster of differentiation* (CD)23) auf der Oberfläche von B-Zellen (Larché et al. 2006). Eine erhöhte Oberflächenexpression von FcεRII wird ebenfalls durch IL-4 induziert (Estes et al. 1995).

In der sog. Effektorphase bei erneutem Allergenkontakt löst das Allergen eine Quervernetzung der oberflächengebundenen IgE-AK aus. Die so stimulierten FcεRI induzieren eine Signalkaskade im Inneren der Effektorzellen, die die Ausschüttung in Granula gespeicherter proinflammatorischer Mediatoren wie Histamin, Tumornekrosefaktor-α (TNFα) und Proteasen zur Folge hat. Auch Prostaglandine und Leukotriene werden von den stimulierten Effektorzellen produziert.

Die Wirkung der Entzündungsmediatoren entfaltet sich innerhalb weniger Minuten in Form einer erhöhten Gefäßpermeabilität, der Konstriktion von Venolen und der Dilata-

tion von Arteriolen. Des Weiteren tritt Histamin-getriggert eine erhöhte Schleimproduktion auf und Leukotriene rufen die Kontraktion glatter Muskulatur hervor wie z.B. an den Bronchien (Hahn et al. 2008, Macfarlane et al. 2000).

Dieser vor allem über den FcεRI ausgelösten Frühphase schließt sich eine Spätphase der allergischen Typ-I-Reaktion an, die ihre stärkste Ausprägung etwa sechs bis neun Stunden nach Allergenkontakt erreicht (Larché et al. 2006). Für die Verzögerung ist die Aktivierung des FcεRII auf der Oberfläche von APC verantwortlich, zu denen auch B-Zellen gehören. Die von diesem Rezeptor ausgelöste Signalkaskade verstärkt in den APC die Aufnahme von Allergen und die Präsentation gegenüber Th-Zellen. Es kommt zur weiteren Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, die den Zytokinen und Chemokinen der Th-Zellen folgend in das Entzündungsgebiet einwandern.

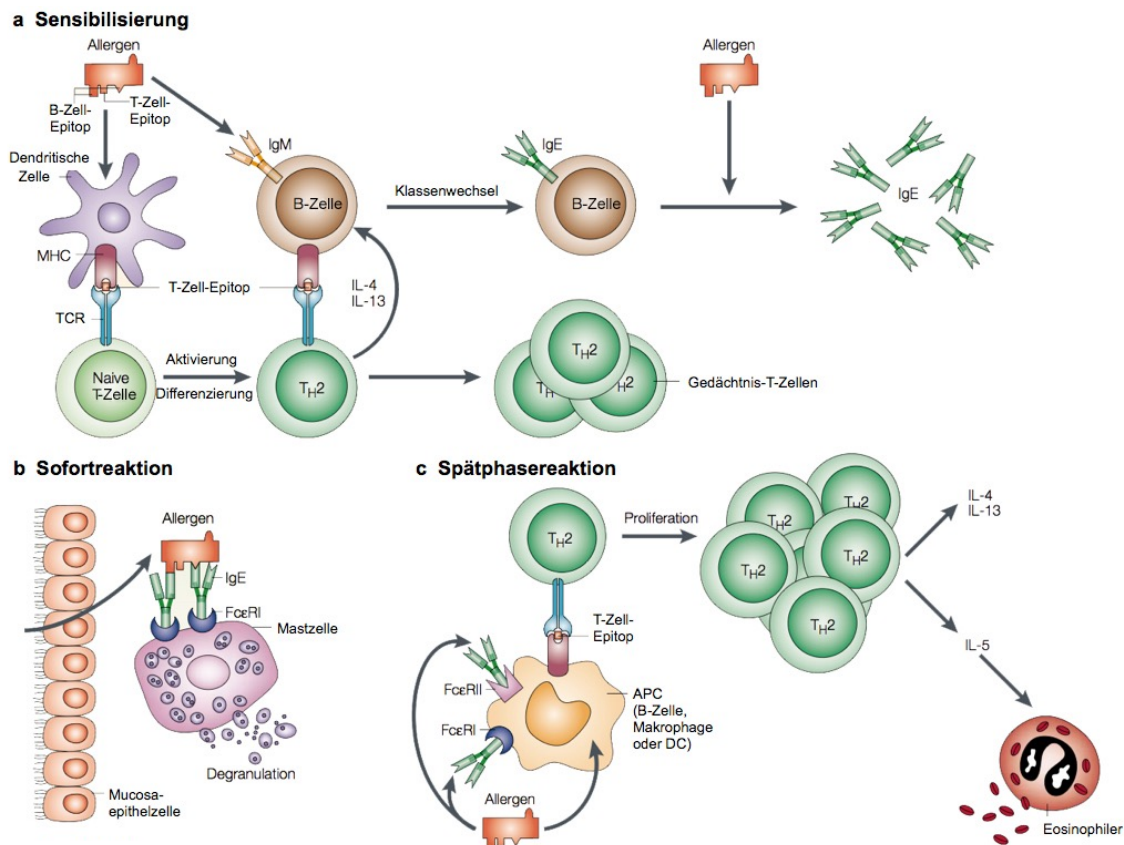


Abbildung 1: Pathophysiologischer Mechanismus der allergischen Typ-I-Reaktion (modifiziert nach Valenta 2002).

a) Sensibilisierungsphase: Nach initialem Allergenkontakt wird das Allergen von allergenpräsentierenden Zellen aufgenommen und naiven T-Zellen über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert. Durch einen Interleukin (IL)-4-abhängigen Prozess kommt es zur Bildung von T-Helfer (Th)2-Zellen, die durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 einen Klassenwechsel von IgG zu IgE hervorrufen. Die IgE-Antikörper werden an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen und an FcεRII auf B-Zellen gebunden.

b) Sofortreaktion: Die Quervernetzung des Effektorzell-gebundenen IgE nach erneutem Allergenkontakt führt über die Freisetzung von biologisch aktiven Stoffen zur Entstehung einer Entzündungsreaktion.

c) Spätphasereaktion: Durch Allergenpräsentation gegenüber T-Zellen werden diese aktiviert, proliferieren und setzen weitere Entzündungsmediatoren frei. Th2-Zytokine bedingen eine Gewebseosinophilie und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.

1.8 Spezifische humorale Komponenten der allergischen Reaktion

Schon im Mutterleib wird der Embryo von der Mutter gegen Infektionen nach der Geburt geschützt. AK der Klasse IgG passieren die Plazentaschranke und ermöglichen durch ihre lange Halbwertszeit die Infektabwehr bis das Neugeborene einen eigenen Schutz aufgebaut hat (Raghavan und Bjorkman 1996). Diese durch AK vermittelte Immunantwort wird daher auch erworbene oder humorale Komponente des Immunsystems.

tems genannt im Gegensatz zur Zell-basierten angeborenen Immunantwort (Hahn et al. 2008).

Immunglobuline bestehen aus zwei identischen sog. Fab-Regionen, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, und einer Fc-Region, die die Bindung des AK an einen Fc-Rezeptor ermöglicht (Hahn et al. 2008). Neben IgG existieren die AK-Klassen IgA, IgD, IgE und IgM, wobei vor allem IgE eine wichtige Rolle bei der allergischen Soforttypreaktion spielt (vgl. Kap. 1.7). Da IgE und insbesondere IgG von zentraler Bedeutung in dieser Arbeit sind, werden sie im Folgenden näher erläutert.

1.8.1 IgE

Entscheidendes Merkmal der allergischen Soforttypreaktion ist die nach Allergenkontakt einsetzende Quervernetzung von IgE-Rezeptor-Komplexen auf Effektorzellen (Hahn et al. 2008). Diese führt zur Degranulation der Zellen und proinflammatorischen Signalen. Trotz der sehr kurzen Plasma-Halbwertszeit von IgE (ca. 2,5 Tage) fällt diese Reaktion bereits bei Kontakt mit geringen Allergenmengen sehr stark aus (Poulsen und Hummelshoj 2007). Dies liegt zum Einen daran, dass der größte Teil des IgE in zellgebundener Form vorliegt und daher eine deutlich höhere Halbwertszeit aufweist. Zum Anderen zeichnet sich IgE durch eine extrem hohe biologische Aktivität aus, die durch hochaffine FcεRI ermöglicht wird (Platts-Mills 2001). Mastzellen und Basophile reagieren so auch bei geringen IgE-Plasmaspiegeln hoch sensitiv auf Allergenkontakt. Neben dem hochaffinen IgE-Rezeptor existiert der niedrigaffine FcεRII (auch CD23) insbesondere auf B-Lymphozyten und Eosinophilen. IgE ist in der Lage, direkt die Expression von FcεRI und FcεRII zu regulieren, wobei die IgE-Plasmaspiegel mit der Expression der Rezeptoren korrelieren (Kisselgof und Oettgen 1998, Lantz et al. 1997, Yamaguchi et al. 1997). Pathophysiologisch sind allergenspezifische IgE-AK so auch für die Potenzierung der allergischen Reaktion verantwortlich. Der gegenteilige Effekt, die Suppression der Expression von FcεRI, kann u.a. durch regulatorische T (Treg)-Zellen vermittelt werden (Kashyap et al. 2008).

1.8.2 IgG

IgG ist der Immunglobulin-Isotyp mit der höchsten Konzentration im Blut (Schroeder und Cavacini 2010). Gleichzeitig besitzt es die längste Halbwertszeit aller Isotypen. Es existieren vier Unterklassen, die wie folgt abhängig von ihrer Konzentration im Blut gesunder Personen benannt sind: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Die Unterklassen unterscheiden sich außerdem in ihrer Funktion. Während IgG1, IgG2 und IgG3 effektiv nach Opsonierung eines Pathogens die Komplementkaskade aktivie-

ren können, trifft dies nicht auf IgG4 zu (Schroeder und Cavacini 2010). Ursache ist die niedrige Affinität zu C1q, der ersten Komponente des Komplementsystems.

Auch die Aktivierung von Zellen fällt durch IgG4 weit geringer aus verglichen mit den übrigen Unterklassen. So bindet IgG4 signifikant schwächer an FcγR, wohingegen IgG1 und insbesondere IgG3 eine hohe Affinität aufweisen (Schroeder und Cavacini 2010, Vidarsson et al. 2014). FcγR werden von vielen hämatopoetischen Zellen in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert, wobei T-Zellen die Ausnahme bilden (Schroeder und Cavacini 2010). Effektormechanismen nach Stimulation durch an ein Pathogen gebundene IgG-AK sind Phagozytose, Endozytose, AK-basierte zellvermittelte Zytotoxizität, Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren und die Regulation von B-Zell-Aktivierung und AK-Produktion (Raghavan und Bjorkman 1996). Dabei löst eine Rezeptorbindung generell ein aktivierendes Signal aus und auch in diesem Punkt stellt IgG4 eine Ausnahme dar. Über einen Subtyp des FcγRII, den FcγRIIB, wird durch IgG4 ein inhibitorisches Signal an die Immunzelle übertragen (Aalberse et al. 2009, Schroeder und Cavacini 2010), sodass eine vermehrte Produktion von IgG4 eine supprimierende Funktion auf die Immunantwort haben könnte. An diesem Prozess sind während der AIT Treg-Zellen maßgeblich beteiligt, die durch die Ausschüttung von IL-10 die IgG4-Produktion erhöhen (Akdis et al. 2005). Durch die IgG4-vermittelte Aktivierung von FcγR auf Makrophagen wird in einem Rückkoppelungsmechanismus wiederum die Produktion von IL-10 induziert (Sutterwala et al. 1998).

Neben der genannten möglichen Regulation der Immunantwort über FcγRII kommen weitere IgG-abhängige Effekte als Ursachen der Allergentoleranz in Frage. AK der IgG-Klasse treten in Konkurrenz zu Mastzell-gebundenen IgE-AK und blockieren so die Bindung des Allergens an diese (Aalberse et al. 2009). In der Folge findet keine Aktivierung von Effektorzellen statt. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch Einsatz unter AIT gebildeter allergenspezifischer IgG-AK eine IgE-vermittelte Anaphylaxie *in vivo* verhindert werden kann (Strait et al. 2006). Zuvor war bereits beobachtet worden, dass Bienengiftallergiker nach Infusion aufgereinigten Plasma-IgGs von nicht auf Bienengift reagierenden Imkern erneute Stiche tolerierten (Lessoif et al. 1978). Diese Beobachtungen prägten in der Folge die Hypothese der blockierenden AK.

Neben der Prävention IgE-vermittelter Soforttyp-Symptome (vgl. Abb. 1b) beeinflussen IgG-AK zudem den Mechanismus der allergischen Spätreaktion (Aalberse et al. 2009). Die Komplexbildung mit Allergenmolekülen verhindert eine effektive Bindung dieser an die oberflächengebundenen IgE-Moleküle von APC. Ohne diesen entscheidenden Schritt kommt es zu keiner Präsentation des Allergens gegenüber T-Zellen (vgl. Abb. 1c).

1.9 Blockierende Antikörper – quantitative und qualitative Messmethoden

Auf der Suche nach einem geeigneten diagnostischen Laborparameter zur Erfassung der Effektivität der AIT haben das allergenspezifische IgG und insbesondere IgG4 viel Beachtung erfahren. Die Konzentration dieser blockierenden AK steigt während der Therapie an und wurde als Erfolgsindikator des toleranzinduzierenden Effekts der AIT gesehen. In zahlreichen Studien konnte jedoch keine Korrelation zwischen quantitativen Veränderungen der Immunglobulinkonzentrationen und dem klinischen Erfolg der AIT gefunden werden (Lerch und Müller 1998, Wachholz und Durham 2004). Messungen der spezifischen IgG- bzw. IgG4-AK-Konzentrationen sind folglich zur Beurteilung des Therapieerfolgs zwar hilfreich, aber nur bedingt aussagekräftig.

Mehr klinische Relevanz versprechen an dieser Stelle Verfahren, die den qualitativen Einfluss der IgG-AK aufzeigen. Es wird davon ausgegangen, dass sich unter AIT die Affinität oder Spezifität der AK erhöht (Shamji et al. 2006) und so eine funktionelle (qualitative) Bestimmung der blockierenden Effekte den Erfolg der Therapie besser erfassbar macht als die quantitative Messung der AK-Konzentrationen. Solche qualitativen Analyseverfahren stellen der sog. *IgE-blocking factor* Assay und der *IgE-facilitated antigen binding* Assay dar, deren Methodik im Folgenden erläutert wird.

1.9.1 *IgE-blocking factor* Assay

Mit diesem Verfahren kann der Einfluss potentieller blockierender AK auf die IgE-Allergen-Komplexbildung ermittelt werden („*blocking factor*“). Es basiert auf der Erfassung allergenspezifischer IgE-Konzentrationen mit dem ADVIA Centaur Instrument (Siemens Healthcare). Dabei werden zwei verschiedene Messungen in Relation zueinander gesetzt (Abb. 2). In der ersten Messung („*wash assay*“) werden dem Testserum an anti-IgE-AK gebundene paramagnetische Partikel (anti-IgE-PMP) zugefügt. In der Folge ist es möglich, die im Serum enthaltenen IgE-AK in einem ersten Waschvorgang mit einem Magneten zu isolieren. Im nächsten Schritt wird Allergen hinzugefügt, sodass IgE-Allergen-Komplexe entstehen. Das Allergen ist dabei biotinyliert und bindet im darauffolgenden Schritt an zugefügtes Streptavidin. Ein zweiter Waschvorgang unter erneutem Einsatz des Magneten trennt die IgE-Allergen-Komplexe von ungebundenem Allergen und Streptavidin. Nun kann die Menge der entstandenen IgE-Allergen-Komplexe durch Zugabe von Substrat und TMB-Lösung als Absorption erfasst werden.

Die zweite Messung („*no-wash assay*“) erfolgt nach dem gleichen Vorgehen, jedoch entfällt der erste Waschvorgang. Folglich werden die markierten IgE-AK nicht von potentiellen blockierenden AK getrennt und es entsteht eine Konkurrenzsituation um die Komplexbildung mit dem Allergen. Nach Ausführung der übrigen Schritte kann bei vor-

liegenden blockierenden AK im „no-wash assay“ eine niedrigere Absorption als im „wash assay“ gemessen werden. Die dimensionslose Zahl des *IgE-blocking factor* wird schließlich als Quotient der Absorption des „wash“ und des „no-wash assays“ berechnet (Shamji et al. 2012, Würtzen et al. 2008).

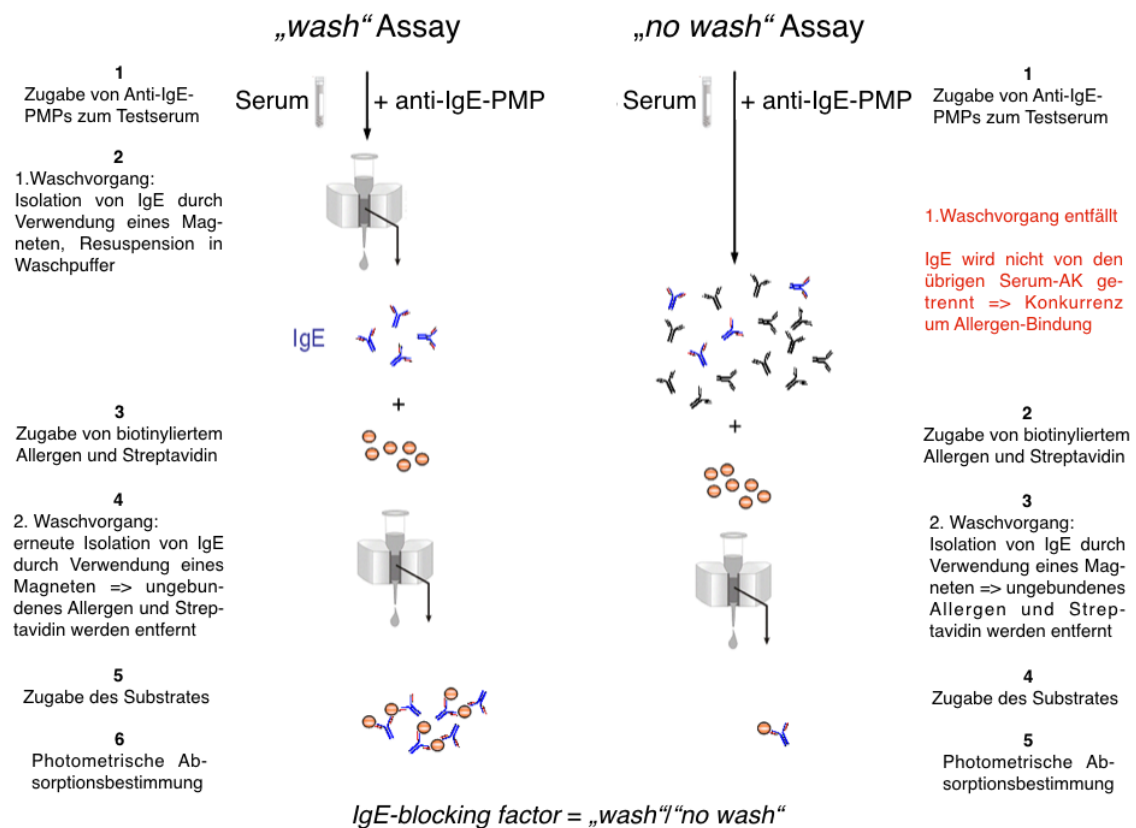


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *IgE-blocking factor* Assays.

1.9.2 *IgE-facilitated antigen binding (IgE-FAB) Assay*

Der IgE-FAB Assay stellt eine vereinfachte *in vitro*-Nachahmung der Allergenpräsentation von B-Zellen gegenüber T-Zellen dar. *In vivo* werden IgE-Allergen-Komplexe von niedrig-affinen IgE-Rezeptor CD23 auf B-Zellen gebunden, die anschließend in die sekundären lymphatischen Organe einwandern. Hier erfolgt die Präsentation der Antigene gegenüber CD4-positiven (CD4⁺) T-Zellen entsprechend der Spätphasereaktion der allergischen Typ-I-Reaktion (vgl. Abb. 1c).

In vitro wird dieser Prozess unter Verwendung von Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierten humanen B-Zellen realisiert (Shamji et al. 2006, Würtzen et al. 2008). Diese exprimieren hohe Konzentrationen an CD23, der spezifisch IgE-Allergen-Komplexe bindet.

Um mit dem IgE-FAB die blockierende Aktivität im Testserum von Patienten zu bestimmen, ist es nötig zwei Messungen in Relation zu setzen. In einem ersten *well* wird Indikatorserum, das hochaffine allergenspezifische IgE-AK enthält, mit Allergen inkubiert und anschließend Medium zugegeben (Abb. 3; Francis 2008, Shamji et al. 2006, Würtzen et al. 2008). Dies stellt die „Positivkontrolle“ dar, allergenspezifische IgE-Moleküle und Allergen bilden Komplexe, die von CD23 der B-Zellen selektiv gebunden werden. In einem weiteren *well* wird nach der Inkubation statt Medium das Testserum mit potentiell blockierenden IgG-AK zugegeben. Auch hier bilden IgE-Antikörper Komplexe mit dem Allergen aus, können dabei jedoch von blockierenden AK behindert werden, wobei der genaue Mechanismus noch nicht verstanden ist. In der Folge werden je nach Ausprägung der blockierenden Aktivität weniger IgE-Allergen-Komplexe von den B-Zellen gebunden.

Mittels Durchflusszytometrie können anschließend unter Verwendung eines Fluorochrom-gekoppelten anti-IgE-AK die gebundenen IgE-Allergen-Komplexe detektiert werden (Shamji et al. 2006, Würtzen et al. 2008). Um die blockierende Aktivität zu bestimmen, findet ein prozentualer Vergleich der gebundenen Komplexe in der Positivkontrolle und in dem mit Testserum versehenen *well* statt.

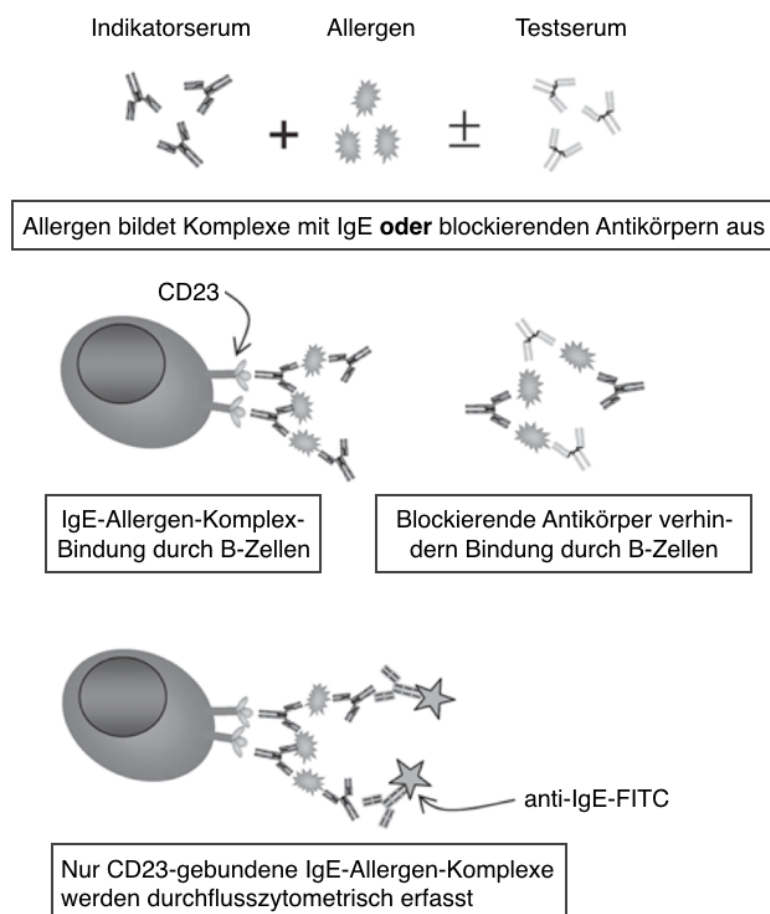


Abbildung 3: Schematische Darstellung des IgE-FAB Assays (modifiziert nach Francis 2008).

Die Methode des IgE-FAB ist inzwischen für zahlreiche Allergene etabliert, die nötige zweiwöchige Kultivierung von EBV-Zellen und die vergleichbar aufwendige durchflusszytometrische Auswertung limitieren jedoch den Umfang der Messungen.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten *enzyme-linked immunosorbent facilitated antigen binding* (EliFAB) Assay hingegen können diese Schwierigkeiten umgangen werden. Er basiert auf den Grundlagen des *enzyme-linked immunosorbent Assay* (ELISA). CD23 wird direkt auf einer Reaktionsplatte gebunden anstatt über EBV-transformierte B-Zellen zur Verfügung zu stehen. Von CD23 spezifisch gebundene IgE-Allergen-Komplexe werden durch einen biotinylierten IgE Detektions-AK, Streptavidin mit HRP und TMB Substrat nachgewiesen.

In ersten Messungen mit Graspollenallergikern zeigte sich, dass mit dem EliFAB Assay IgE-Allergen-Komplexbindung durch CD23 bereits bei niedrigeren Allergenkonzentrationen detektiert werden kann als mit dem IgE-FAB Assay (Shamji et al. 2013). Beim direkten Vergleich des neuen Verfahrens mit dem Gold-Standard IgE-FAB konnte eine diagnostische Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 91 % ermittelt werden. Positiver und negativer prädiktiver Wert betrugen 91 % bzw. 100 %. Im Serum therapierter Patienten wiesen beide Verfahren die gleiche Inhibition der IgE-Allergen-Komplexbindung nach.

Der EliFAB Assay repräsentiert folglich eine einfache und gut zu reproduzierende Methode, um die Effekte blockierender AK auf die IgE-Allergen-Komplexbildung und -bindung durch CD23 zu erfassen (Shamji et al. 2013). Im Gegensatz zum Gold-Standard IgE-FAB eröffnet der EliFAB Assay neue Möglichkeiten in Standardisierung, Skalierbarkeit, Kosten und Zeitaufwand.

2 Hintergründe der vorliegenden Arbeit

Während Pollenallergiker anhand klinischer Symptome in der Pollensaison die Ausprägung ihrer Allergie erfassen können, ist die tatsächliche Wirksamkeit der AIT bei Insektengiftallergikern abhängig von einem erneuten Stichereignis und somit zumeist nicht sicher feststellbar. Aufschluss über den Erfolg der Behandlung kann neben dem Feldstich nur eine Stichprovokation geben. Mit beiden können jedoch zahlreiche Probleme einhergehen. So ist es bei einem Feldstich oft nicht möglich das betreffende Insekt sicher zu identifizieren. Vor allem aber werden auftretende Symptome der allergischen Reaktion subjektiv bewertet, was eine Einschätzung des Therapieerfolgs erschwert. Im Falle einer unter kontrollierten Bedingungen im Krankenhaus durchgeführten Stichprovokation lassen sich diese Unwägbarkeiten sowie lebensbedrohliche Folgen zwar nahezu vollständig ausräumen, aus jedem Stich ergeben sich zudem jedoch weitere Risiken. Als solche gelten insbesondere eine *de novo*-Sensibilisierung gegenüber einem weiteren im Gift enthaltenen Allergen und die Verstärkung einer bereits bestehenden Sensibilisierung. So wird beschrieben, dass nach Stichen durch Insekten der Ordnung der Hymenopteren eine erhöhte Reaktion im PT sowie ein Ansteigen der spezifischen IgE-AK beobachtet werden können (Ruëff et al. 1996). In der Konsequenz bieten viele Kliniken die Stichprovokation erst gar nicht an. Auch weil sie durch die Erfordernis konsequenter Monitorings, ärztlicher Aufsicht sowie das Vorhandensein eines Notfallsets und Intubationsbestecks mit einem hohen Aufwand verbunden ist.

Auf der Suche nach einem geeigneten Laborparameter zur Bestimmung der Effektivität der AIT konnten in den vergangenen Jahren Verfahren etabliert werden, die durch Erfassung des Einflusses blockierender AK auf die Bildung von IgE-Allergen-Komplexen (IgE-blocking factor) bzw. auf deren Bindung an CD23 von EBV-transformierten B-Zellen (IgE-FAB) eine Messung der blockierenden Aktivität der AK ermöglichen. Eine neue Methode eröffnet nun erstmals die Möglichkeit der Nutzung eines zellfreien Testsystems ebenfalls basierend auf der Inhibition der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen an CD23. Erste Studien zeigten eine signifikante inverse Korrelation zwischen der blockierenden Aktivität im Testserum und klinischen Symptom- und Medikationsscores bei Pollenallergikern (Shamji et al. 2012). Eine zunehmende blockierende Aktivität wird somit in Verbindung mit dem Erfolg der AIT gebracht, weitere Studien werden diesen Zusammenhang jedoch prüfen müssen.

Insbesondere für die Therapie von Hymenopterengiftallergikern erwachsen aus diesen Ergebnissen vielversprechende Möglichkeiten. Mit einer zuverlässigen Messung des durch die Therapie aufgebauten immunologischen Schutzes könnten Stichprovokationen der Vergangenheit angehören und Patienten von der stetigen Angst um eine Stich-

reaktion befreit werden. Auf Basis der Messung von Effekten blockierender AK könnte ein Entscheidungskriterium gefunden werden, das es erlaubt, eine Aussage über den Schutz eines Patienten gegenüber einer erneuten systemischen Reaktion zu treffen.

In dieser Arbeit wurde dazu der EliFAB Assay zur Messung der blockierenden Aktivität bei Hymenopterengiftallergikern etabliert, die gegen das jeweilig häufigste Majorallergen in Bienen- oder Wespengift sensibilisiert sind. Es wurde im weiteren Verlauf die blockierende Aktivität vor, unter und – bei Auftreten eines Feldstichs – einige Jahre nach Ende der AIT erfasst.

3 Material

3.1 Patientenmaterial

Serum und Plasmaproben

Patienten der Universitätsklinik für
Dermatologie und Allergologie Marburg

3.2 Proteinantigene

Api m 1 (PLA₂)

Latoxan, Valence, Frankreich

rekombinantes Bet v 1

Biomay, Wien, Österreich

rekombinantes Ves v 5

freundlicherweise zur Verfügung gestellt
von Prof. Dr. Edzard Spillner, Aarhus
Universität, Aarhus, Dänemark

3.3 Chemikalien

Dulbecco's PBS 1x (ohne Ca²⁺ + Mg²⁺)

Capricorn Scientific GmbH,
Ebsdorfergrund

ExtrAvidin Peroxidase

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim

Glycin (C₂H₅NO₂)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Reinstwasser

hergestellt mit dem Astacus
Reinstwassersystem, MembraPure
GmbH, Hennigsdorf/Berlin

Natriumazid (NaN₃)

Merck KGaA, Darmstadt

Natriumphosphat dibasisch (HNa₂O₄P)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim

Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow

GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Rinderalbumin Fraktion V (BSA)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

RPMI 1640 ohne Glutamin

Capricorn Scientific GmbH,
Ebsdorfergrund

Salzsäure (HCl)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Schwefelsäure (H₂SO₄), 95-97%

Merck KGaA, Darmstadt

TMB, gelöst

EMD chemicals Inc., San Diego, USA

TMB, gelöst

EMD chemicals Inc., San Diego, USA

Tween® 20

Merck KGaA, Darmstadt

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	Dulbecco's PBS 1x + 0,05 % Tween 20 → Lagerung bei Raumtemperatur
Blockierungspuffer	Dulbecco's PBS 1x + 1 % BSA → Lagerung bei -20 °C
Stop Lösung	Reinstwasser + 10 % 18 mol/l H ₂ SO ₄ → Lagerung bei 4 °C
Bindungspuffer	Reinstwasser + 20 mM Natriumphosphat → auf pH 7,0 einstellen → Lagerung bei Raumtemperatur
Elutionspuffer	Reinstwasser + 0,1 M Glycin → auf pH 2,7 einstellen → Lagerung bei 4 °C

3.5 Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller
IgE	G7-26	Mouse IgG2a, κ	Biotin	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

rhCD23/
FcεRII

Maus Myelom-Zelllinie, NS0-abgeleitet

R&D Systems,
Wiesbaden-Nordenstadt

3.6 Verbrauchsartikel

96-well (Loch) Rundbodenplatten, steril

Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

96-well Flachbodenplatten (Nunc MediSorp)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Rotilabo® Abdeckfolien für Mikrotestplatten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Depletionssäulen ‚Disposable columns‘ 5 ml	Qiagen GmbH, Hilden
Einweg-Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Kalensee, Gießen

3.7 Geräte

Analysenwaage 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
CO ₂ -Inkubator HERAcell® 150	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
ImmunoCap® 100	Thermo Fisher Scientific Inc.; Phadia AB, Uppsala, Schweden
Kühlzentrifuge ROTINA 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Magnetrührer IKAMAG® RET	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Discovery 20-200 µl	ABIMED, Langenfeld
Microplate reader Sunrise™	Tecan Group Ltd., Männedorf
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter CyberScan pH 510	Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk, Niederlande
Pipetten Research® 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Rollenmischgerät RM 5, CE (348)	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Rüttler Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach
Sterilbank HERAsafe®	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Tischzentrifuge PICO FUGE	Stratagene, La Jolla, USA

Vortexmixer IKA® Minishaker MS1

IKA Labortechnik, Staufen

3.8 Software

Endnote 9.0

Thomson ResearchSoft, USA

GraphPad Prism®

GraphPad Software Inc., USA

Keynote®

Apple Inc., USA

Microsoft® Excel

Microsoft, USA

Microsoft® Word

Microsoft, USA

Pages®

Apple Inc., USA

SPSS® 17.0

SPSS Inc., USA

XFluor™

Tecan Group Ltd., Männedorf

4 Methoden

4.1 Patientenkollektive

Die untersuchten Serum- bzw. Plasmaproben stammen von Patienten, die in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg eine Immuntherapie aufgrund einer Allergie gegenüber Bienen- bzw. Wespengift erhalten haben.

Aus diesen Patienten wurden mehrere Kollektive gebildet. Darunter waren zwei longitudinale Untersuchungen, die den Verlauf der AIT zum Zeitpunkt der Einleitungsphase (Patientenkollektiv „Ultra Rush“) bzw. zum Zeitpunkt der Stichprovokation (Patientenkollektiv „Stichprovokation“ und Subgruppe „Wespengiftallergiker unter AIT“) umfassten. Querschnittsuntersuchungen mit einmaliger Datenerhebung schlossen Patienten 5-12 Jahre nach Abschluss einer AIT ein, die von einem in diesem Zeitraum erlebten Feldstich berichtet hatten (Patientenkollektiv „Feldstich“ und Subgruppe „Wespengiftallergiker nach AIT“). Da von weiteren Patienten der Studienpopulation mit einer klinisch manifesten Allergie gegenüber Bienen- bzw. Wespengift nur vor Therapiebeginn Serumproben gewonnen werden konnten, ergab sich eine weitere Querschnittuntersuchung. Diese Proben ergaben dabei zusammen mit den jeweils ersten ebenfalls vor Therapiebeginn abgenommenen Proben des Patientenkollektivs „Ultra Rush“ die Patientenkollektive „Bienengiftallergiker vor AIT“ und „Wespengiftallergiker vor AIT“. Eine detaillierte Übersicht der einzelnen Kollektive zeigen Tabelle 3 und Abbildung 4.

Als Kontrollen wurden Seren fünf gesunder Personen ohne klinische Zeichen einer Allergie und fehlenden spezifischen IgE-Konzentrationen gegenüber Bienen- bzw. Wespengift in die Untersuchungen eingeschlossen.

Des Weiteren wurden zur Etablierung des Assays auch zwei Serum- bzw. Plasmaproben von Bet v 1-sensibilisierten Patienten verwendet. Ziel war dabei die Überprüfung des EliFAB Assays gemäß der Erstveröffentlichung an Pollenallergikern (Shamji et al. 2013). Die eingesetzten Test- sowie Indikatorseren stammen dabei von Patienten, die eine AIT mit einem Birkenpollen-Präparat erhalten haben (vgl. dazu auch 4.3.3).

Von jedem Patienten wurde vor Einschluss in die Studie ein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den Untersuchungen eingeholt, welche zuvor von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt worden waren. Zu jedem Zeitpunkt der Studie war es den Patienten möglich ohne Nachteile von der Teilnahme an den Untersuchungen zurückzutreten.

Tabelle 3: Übersicht der gebildeten Patientenkollektive.

Patientenkollektiv „Ultra Rush“	n=8	Spannweite
Verteilung (Bienen-/Wespenallergiker)	3/5	
Geschlecht (m/w)	3/5	
Alter (Mittelwert in Jahren)	46	(35-61)
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	50,25	(5,08-144)
allergenspezifisches IgE (Median in kUA/l)	1,83	(0,24-6,08)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	2	
II	5	
III	1	
IV	0	
Patientenkollektiv „Bienengiftallergiker vor AIT“	n=13	Spannweite
Geschlecht (m/w)	10/3	
Alter (Mittelwert in Jahren)	53	(29-77)
Imker	9	
Patienten mit Imkern in unmittelbarer Umgebung	2	
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	41,2	(9,35-123)
Api m 1-spezifisches IgE (Median in kUA/l)	1,08	(0,02-25,9)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	3	
II	8	
III	2	
IV	0	
Patientenkollektiv „Wespenallergiker vor AIT“	n=14	Spannweite
Geschlecht (m/w)	6/8	
Alter (Mittelwert in Jahren)	49	(23-65)
Imker	0	
Patienten mit Imkern in unmittelbarer Umgebung	1	
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	69,45	(11,7-623)
Ves v 5-spezifisches IgE (Median in kUA/l)	2,02	(0,61-16,2)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	5	
II	6	
III	3	
IV	0	

Patientenkollektiv „Stichprovokation“	n=20	Spannweite
Verteilung (Bienen-/Wespenallergiker)	6/14	
Geschlecht (m/w)	7/13	
Alter (Mittelwert in Jahren)	50	(23-68)
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	86,4	(2,19-293)
Ves v 5- bzw. Api m 1-spezifisches IgE (Median in kUA/l)	2,06	(0,07-42,6)
Zeitspanne nach Einleitung (Mittelwert in Monaten)	17	(6-50)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	1	
II	12	
III	7	
IV	0	
Subgruppe „Wespenallergiker unter AIT“	n=14	Spannweite
Geschlecht (m/w)	5/9	
Alter (Mittelwert in Jahren)	53	(23-66)
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	86,4	(2,19-265)
Ves v 5-spezifisches IgE (Median in kUA/l)	2,04	(0,07-31,2)
Zeitspanne nach Einleitung (Mittelwert in Monaten)	16	(8-24)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	1	
II	8	
III	5	
IV	0	

Patientenkollektiv „Feldstich“	n=13	Spannweite
Verteilung Feldstich (Bienen-/Wespengiftallergiker)	2/11	
Anzahl Patienten mit/ohne Stichreaktion	5/8	
Verteilung bei Stichreaktion (Biene/Wespe)	0/5	
Geschlecht (m/w)	4/9	
Alter (Mittelwert in Jahren)	63	(48-76))
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	21,9	(5,2-112)
allergenspezifisches IgE (Median in kUA/l)	0,72	(0,01-8,59)
Zeitspanne nach Ende der AIT (Mittelwert in Jahren)	9	(5-12)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	0	
II	8	
III	5	
IV	0	
Subgruppe „Wespengiftallergiker nach AIT“	n=11	Spannweite
Geschlecht (m/w)	3/8	
Alter (Mittelwert in Jahren)	62	(48-76)
Gesamt-IgE (Median in kUA/l)	21,3	(5,2-112)
Ves v 5-spezifisches IgE (Median in kUA/l)	0,66	(0,01-8,59)
Zeitspanne nach Ende der AIT (Mittelwert in Jahren)	9	(5-12)
Schweregrad nach Ring u. Messmer		
I	0	
II	7	
III	4	
IV	0	

4.1.1 Einschlusskriterien

Die Diagnose einer Allergie vom Soforttyp auf Bienen- bzw. Wespengift musste auf mehreren Kriterien basieren. Dazu gehörte die Anamnese einer Anaphylaxie nach Sticheignis sowie der Nachweis einer Sensibilisierung gegen Bienen- bzw. Wespengift im PT oder Intrakutantest bzw. durch serologischen Nachweis Insektengift-spezifischer IgE-AK.

Das Alter der Patienten musste zwischen 18 und 80 Jahren liegen und eine unterschriebene Zustimmungserklärung vorliegen.

4.1.2 Ausschlusskriterien

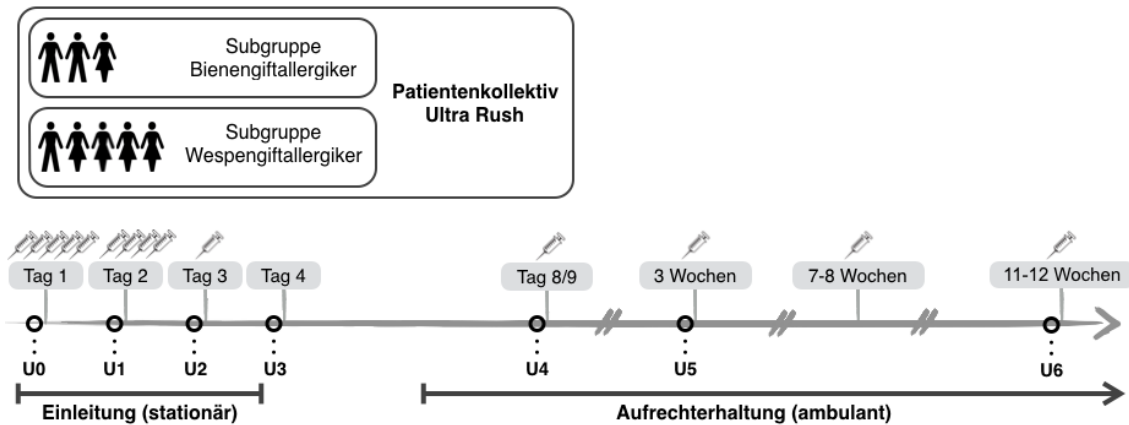
Bei Kontraindikationen für die Durchführung einer AIT mit Hymenoptergift wurden Patienten nicht aufgenommen, ebenso Minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten.

4.2 Allergenspezifische Immuntherapie und Studiendesign

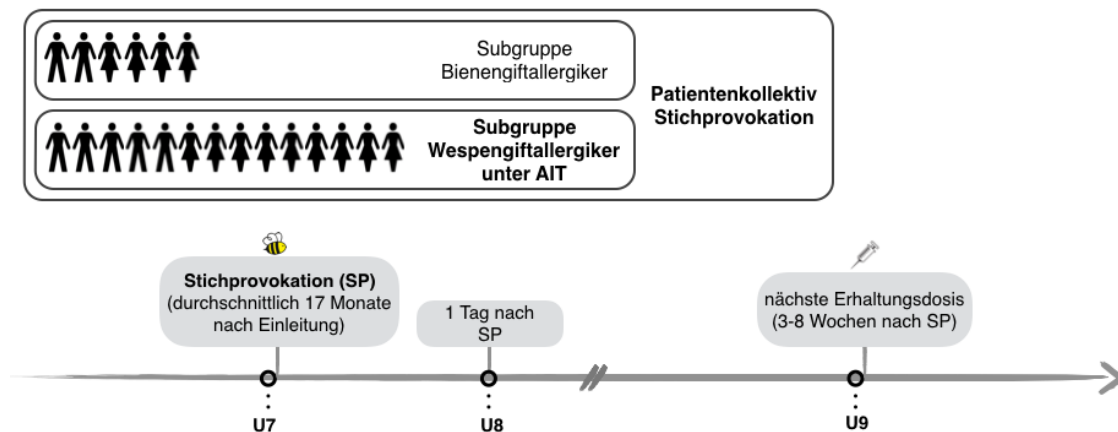
Alle untersuchten Patienten erhielten eine AIT entsprechend aktueller AWMF Leitlinie (Pfaar et al. 2014). Die Einleitungsphase wurde nach einem Ultra Rush-Protokoll stationär in der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 10 Injektionen nach dem in Abbildung 4 (A) gezeigten Schema verabreicht. Während der anschließenden Aufrechterhaltung erfolgte die Behandlung ambulant, die Erhaltungsdosis wurde dabei am achten oder neunten Tag sowie ca. drei Wochen nach Abschluss der Einleitung appliziert. Weitere Erhaltungsdosen folgten im Abstand von 4-6 Wochen. Die Behandlungen erfolgten mit Bienen- bzw. Wespengift der Firma ALK-Abelló (Hamburg). Die genauen Dosierungen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Zur Sicherung des Therapieerfolgs wurde bei den Patienten nach durchschnittlich 17 Monaten eine Stichprovokation mit einem lebenden Insekt durchgeführt. Im Falle einer erneuten systemischen Reaktion wurde empfohlen, die Erhaltungsdosis zu erhöhen.

A



B



C

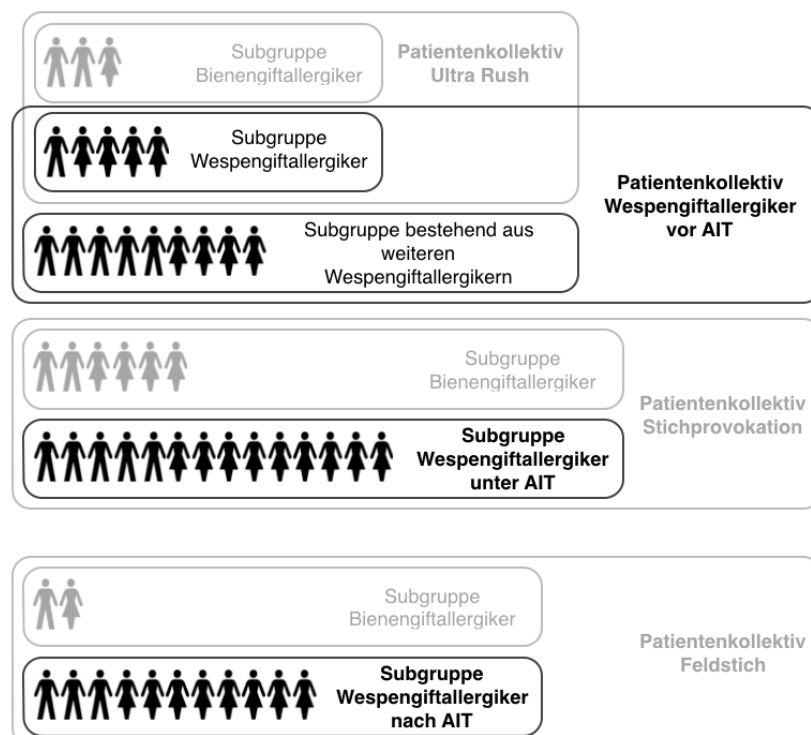


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT), Entnahme von Serumproben und Überblick der Patientenkollektive. Patientenkollektiv Ultra Rush (A), Patientenkollektiv Stichprovokation (B), Patientenkollektive bzw. Subgruppen Wespengiftallergiker vor, unter und nach AIT (C).

Tabelle 4: Dosierungsschema des Ultra Rush-Protokolls. Dosierungsangaben der verwendeten Bienen- bzw. Wespengiftpräparate gemäß Hersteller (ALK-Abelló, Hamburg) in standardisierten Qualitäts (SQ)-Einheiten (100 SQ-Einheiten = 100 µg Hymenopterengift).

Injektion	Tag	Stunden	Dosierung [SQ-Einheiten/Injektion]
1	t0	0	10
2	t0	1	100
3	t0	2	1.000
4	t0	3	10.000
5	t0	5,5	20.000
6	t1	0	40.000
7	t1	2	60.000
8	t1	4	80.000
9	t1	6	100.000
10	t2	0	100.000

4.3 Serologische Diagnostik

4.3.1 Zeitpunkte der Probengewinnung

Blutproben wurden von den Patienten der Ultra Rush-Gruppe zu folgenden Zeitpunkten jeweils vor der Injektion des Allergenpräparates abgenommen (Abb. 4 A):

U0: vor Beginn der Therapie

U1: Tag 1 nach Einleitung der AIT

U2: Tag 2 nach Einleitung der AIT

U3: Tag 3 nach Einleitung der AIT (Entlassungstag der stationären Aufdosierung)

U4: erste ambulante Erhaltungsdosis (Tag 8/9 nach Einleitung der AIT)

U5: zweite ambulante Erhaltungsdosis (etwa 3 Wochen nach Einleitung der AIT)

U6: vierte ambulante Erhaltungsdosis (etwa 11-12 Wochen nach Einleitung der AIT)

In der Stichprovokationsgruppe erfolgten Blutentnahmen unmittelbar vor (U7) und einen Tag nach der Stichprovokation (U8) sowie vor Gabe der jeweils nächsten Erhaltungsdosis (U9) nach 3-8 Wochen (Abb. 4 B).

Vom Patientenkollektiv „Feldstich“ wurden einmalig 5-12 Jahre nach AIT Proben entnommen (Querschnittsstudie; Abb. 4 C).

4.3.2 IgE-, IgG- und IgG4-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der allergenspezifischen AK-Konzentrationen in den jeweiligen Serumproben erfolgte unter Verwendung des Phadia ImmunoCap Systems (Thermo Fisher Scientific Inc.; Phadia AB, Freiburg) nach Herstellerangaben.

4.3.3 Messung der Effekte blockierender Antikörper mit dem EliFAB Assay

4.3.3.1 Testprinzip

Analog zum IgE-FAB kann im EliFAB Assay der Einfluss eines potentiell blockierende AK enthaltenden Testserums auf die IgE-Allergen-Komplexbindung durch CD23 erfasst werden. IgE-Allergen-Komplexe werden auch hier durch Inkubation des Allergens mit einem Indikatorserum gebildet, das hochaffine allergenspezifische IgE-AK enthält.

Da der EliFAB Assay jedoch auf der Basis eines ELISA-Verfahrens beruht, wird bei dieser Methode statt des Einsatzes von CD23-tragenden B-Zellen eine direkt mit CD23 beschichtete Reaktionsplatte eingesetzt. CD23 bindet selektiv IgE-Allergen-Komplexe, welche nach schrittweiser Zugabe von biotinylierten IgE Detektions-AK, Streptavidin und TMB Substrat photometrisch detektiert werden können (Abb. 5).

Wie im IgE-FAB Assay wird die Messung eines Testserums in Relation zu der stattdessen Medium enthaltenden Positivkontrolle gesetzt. Liegt eine blockierende Aktivität durch IgG-AK im Testserum vor, ist die Absorption geringer gegenüber der Positivkontrolle (in dieser sind keine blockierenden AK enthalten). Aus den Messwerten kann dann eine Prozentzahl relativ zur auf 100 % normalisierten Positivkontrolle errechnet werden. Die so generierten Prozentzahlen ermöglichen einen Vergleich der Effektivität blockierender AK innerhalb des Therapieverlaufs oder zwischen verschiedenen Patienten.

Um kleinere Messungenauigkeiten auszuräumen und eine direkte Bestätigung gemessener Werte zu erlangen, wurde grundsätzlich mit Doppelansätzen gearbeitet und im Anschluss das arithmetische Mittel der gemessenen Absorptionen bestimmt.

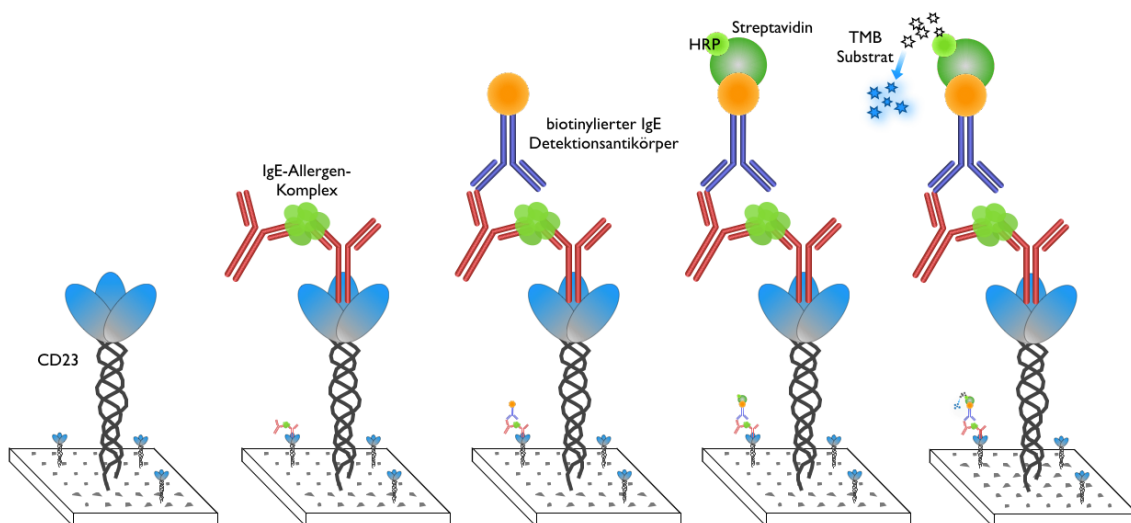


Abbildung 5: Schematische Darstellung des EliFAB-Prinzips.

4.3.3.2 Testdurchführung

Protokoll modifiziert nach Shamji et al. 2013:

1. Beschichten der Mikrotiter-Platte
 - 1.1. 50 µl CD23-Lösung in jedes *well* der Nunc Medi-Sorp 96-*well* Platte pipettieren.
 - 1.2. Die Platte mit einer Abdeckfolie versehen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Herstellen der IgE-Allergen-Komplexe
 - 2.1. 20 µl des IgE-reichen Serums (Indikatorserum) sowie 20 µl des Testserums mit potentieller blockierender Aktivität in eine separate 96-*well*-Rundboden-Platte pipettieren. Als Kontrolle wird statt Testserum 20 µl RPMI verwendet.
 - 2.2. 5 µl der entsprechenden Allergenkonzentration hinzufügen.
 - 2.3. Allergen mit Serum für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.
3. Blocken mit BSA (direkt nach Schritt 2, da beide Platten gleichzeitig inkubieren)
 - 3.1. Die mit CD23 beschichtete Platte 2x mit Waschpuffer waschen (200 µl pro *well*).
 - 3.2. Die Platte mit 200 µl Blockierungspuffer (1% BSA/PBS Lösung) pro *well* blocken.
 - 3.3. Die Platte wieder mit der Abdeckfolie versehen und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren.
4. IgE-Allergen-Komplexe in die CD23-beschichtete Platte übertragen
 - 4.1. Die mit CD23 beschichtete Platte 3x mit Waschpuffer waschen.
 - 4.2. Die Lösung mit den IgE-Allergen-Komplexen auf die CD23-beschichtete Platte übertragen. Darauf achten, dass die Lösung vollständig transferiert wird.
 - 4.3. Mit Abdeckfolie versehen und für 1 h auf dem Rüttler mit ca. 600 U/min bei Raumtemperatur inkubieren.
5. IgE-Antikörper Detektion
 - 5.1. Die Platte 4x mit Waschpuffer waschen.
 - 5.2. Den biotinylierten IgE-spezifischen Detektions-AK 1:1000 in 1% BSA/PBS verdünnen.

- 5.3. 100 µl in jedes *well* pipettieren.
 - 5.4. Mit Abdeckfolie versehen und für 1 h auf dem Rüttler mit ca. 600 U/min bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Streptavidin-Peroxidase
- 6.1. Die Platte 5x mit Waschpuffer waschen.
 - 6.2. Die Streptavidin-Peroxidase 1:1000 in 1% BSA/PBS verdünnen.
 - 6.3. 100 µl in jedes *well* pipettieren.
 - 6.4. Mit Abdeckfolie versehen und für 30 min auf dem Rüttler mit ca. 600 U/min bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Chromogenes Substrat (TMB)
- 7.1. Die Platte 6x mit Waschpuffer waschen.
 - 7.2. 100 µl TMB Lösung in jedes *well* pipettieren.
 - 7.3. Für ca. 10 min im Dunkeln reagieren lassen.
 - 7.4. Die Reaktion mit 50 µl Stop Lösung (1,8 mol/L H₂SO₄) stoppen.
 - 7.5. Die Platte bei 450 nm mittels Microplate Reader auslesen.

Anmerkung:

Die Entwicklungszeit bis zum Abstoppen der Reaktion ist abhängig vom verwendeten Indikatorserum und sollte optimalerweise zwischen 5 und maximal 15 min liegen.

Hintergrund ist die nur zu Beginn proportional zur Entwicklungszeit ansteigende Absorption. Eine optimale Differenzierung der Absorptionen verschiedener *wells* ist nur in der Zeit des proportionalen Anstiegs möglich. Als Richtwert wurde in dieser Arbeit eine Absorption von ca. 1,5 (OD_{450nm}) verwendet.

4.3.4 Depletion von IgG-Antikörpern

Um die direkten Auswirkungen und die Funktion von allergenspezifischen IgG-AK im Patientenserum zu untersuchen, wurden diese unter Verwendung von Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow der Firma GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien) aus dem jeweiligen Patientenserum depletiert. Dieser Prozess umfasste mehrere Durchgänge, wobei der Zeitpunkt der vollständigen IgG-Depletion durch regelmäßige Messung der AK-Konzentration bestimmt wurde. Im Folgenden ist das Protokoll des Depletionsvorgangs aufgeführt:

1. Klemmschlauch auf Depletionssäulenspitze aufsetzen
2. 10 ml Bindungspuffer durchlaufen lassen

3. Kurz vor Flüssigkeitsoberflächenberührung mit Membran abklemmen
4. 0,5 ml Sepharose hinzugeben
5. 5 ml Bindungspuffer langsam hinzugeben
6. *Beads* absetzen lassen (ca. 5 min)
7. Mit 10 ml Bindungspuffer nochmals vorsichtig nachspülen
8. Kurz vor Flüssigkeitsoberflächenberührung mit Sepharose Schlauch abklemmen
9. Serum hinzugeben
10. Säulenöffnung mit Deckel verschließen
11. Schlauch abnehmen, Säulenspitze mit Deckel verschließen
12. Die Säule auf dem Rollenmischgerät für 4 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C rotieren lassen (am besten in einem Falcon-Tube)

Weitere Durchgänge:

- Serum in Falcon-Tube durchlaufen lassen
- je 30 ml Elutionspuffer und Bindungspuffer durchlaufen lassen (kurz vorher wieder abklemmen)
- Serum wieder hinzugeben und Schritt 10-12 folgen

Aufbewahrung:

- verwendete Säule nach durchgelaufenem Elutionspuffer und Bindungspuffer mit 10 ml Bindungspuffer füllen und 0,01% Natriumacid (bei 10 ml Bindungspuffer 50 µl 2%-ige Natriumacidlösung) hinzufügen
- in Falcon Tube bei 4 °C aufbewahren

Reinigung:

- zur Entfernung von Lipid- und Proteinrückständen („weiße Flocken“) 10 ml Waschpuffer durch die Säule laufen lassen
- sofort komplettes Volumen mehrmals mit Bindungspuffer auffüllen und durchlaufen lassen

4.4 Statistik

Die erhobenen AK-Konzentrationen sowie die Inhibition der Bindung von Allergen-IgE-Komplexen im EliFAB wurden aufgrund der nicht-parametrischen Verteilung als Median \pm Spannweite dargestellt. Zur graphischen Veranschaulichung der Verteilung dieser Daten wurden Box-Whisker-Plots verwendet. Dabei gibt die Box den Bereich an, in welchem 50 % der Daten liegen. Sie wird durch das obere 75 %-Quartil und das untere

25 %-Quartil begrenzt. Der Median wird als durchgängiger Balken innerhalb der Box repräsentiert. Die obere und untere Spannweite des Plots umfasst jeweils 25 % der Werte. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen unterhalb des 25 %-Quartils bzw. oberhalb des 75 %-Quartils liegen, stellen statistische Ausreißer dar, welche durch offene Kreise (°) gekennzeichnet werden. Bei Extremwerten (*) handelt es sich um Daten, die mehr als drei Boxlängen unterhalb des 25 %-Quartils bzw. oberhalb des 75 %-Quartils liegen.

Für den Vergleich ungepaarter Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. P-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant angesehen.

Um die Berechnung von IgE/IgG4-Quotienten zu ermöglichen, wurden die im ImmunoCap gemessenen Null-Werte durch 0,01 mgA/l ersetzt. Hintergrund ist der niedrigste für die Messung von allergenspezifischem IgG4 validierte Messwert von 0,01 mgA/l.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Programme GraphPad Prism und SPSS.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung des ELiFAB

Um die einzelnen Komponenten des Verfahrens zu testen, wurde der ELiFAB Assay zunächst für das Majorallergen der Birke, Bet v 1, etabliert. Hintergrund ist die bereits erfolgreiche Etablierung und Anwendung des Assays für Bet v 1 durch Shamji et al. (2013). Dabei wurde wie bei Shamji et al. beschrieben eine CD23-Konzentration von 12,5 µg/ml verwendet.

5.1.1 Screening für geeignete Indikatorseren und Bestimmung der optimalen Allergenkonzentration

5.1.1.1 Bet v 1

Beim Test mehrerer Seren untherapierter Birkenpollenallergiker mit unterschiedlich hoher Bet v 1-spezifischer IgE-Konzentration zeigte sich, dass die für die Verwendung im Assay nötige möglichst hohe IgE-Allergen-Komplexbildung nicht in direktem Zusammenhang mit der Menge allergenspezifischer IgE-AK steht. Am effektivsten wurden IgE-Allergen-Komplexe im Serum eines Patienten mit einer spezifischen IgE-Konzentration von 60,3 kU/l gebildet, sodass sich für diese Konzentration die höchste gemessene Absorption im Assay ergab (Abb. 6 A). Bei der Testung eines weiteren Serums mit höherer IgE-Konzentration zeigte sich hingegen eine niedrigere IgE-Allergen-Komplexbildung.

Trotzdem scheint eine Mindestkonzentration allergenspezifischer IgE-AK nötig zu sein, da weitere Screening-Versuche zeigten, dass Absorptionen über der Negativkontrolle nur bei zwei von sieben Seren gemessen werden konnten (Abb. 6 B). Das Serum mit der höchsten Absorption wies dabei eine Bet v 1-spezifische IgE-Konzentration von 80,15 kUA/l auf. Trotz einer ähnlich hohen IgE-Konzentration konnte in einem weiteren Serum nur eine deutlich geringere IgE-Allergen-Komplexbildung und damit eine niedrigere Absorption im Assay gemessen werden. Die übrigen Patienten wiesen Bet v 1-spezifische IgE-Konzentrationen zwischen 26,1 und 54,2 kUA/l auf, wobei im Assay lediglich Absorptionswerte auf Niveau der Negativkontrolle beobachtet werden konnten (Abb. 6 B).

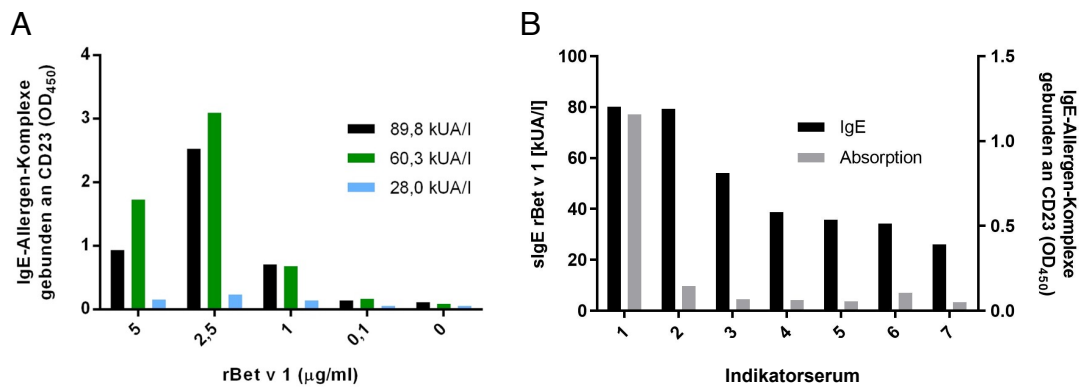


Abbildung 6: Vergleich potentieller Indikatorseren im Bet v 1-spezifischen EliFAB. Bei einem ersten Vergleich von drei Patientenseren, die sich in ihrer Bet v 1-spezifischen IgE-Konzentration um jeweils etwa 30 kUA/l unterschieden, zeigte das Testserum mit einer IgE-Konzentration von 60,3 kUA/l die höchste Absorption und damit die beste Eignung für den EliFAB Assay (A). Trotz der mit 89,8 kUA/l deutlich höheren Bet v 1-spezifischen IgE-Konzentration wies das Vergleichsserum eine geringere Absorption auf. Der Vergleich mehrerer potentieller Indikatorseren im EliFAB erwies sich an dieser Stelle als unerlässlich. Bei der Auswahl der potentiellen Indikatorseren war es zudem sinnvoll, eine Mindestkonzentration allergenspezifischen IgEs zu berücksichtigen. So zeigten alle getesteten Seren mit einer Bet v 1-spezifischen IgE-Konzentration unter 60 kUA/l keine ausreichenden Absorptionswerte im EliFAB (B).

Neben der Komplexbildung von Serum und Allergen wurde im Folgenden auch der Einsatz von Plasma statt Serum im EliFAB Assay überprüft (Abb. 7 A). Dabei ließ sich ein deutlicher Unterschied zwischen Serum- bzw. Plasmaproben desselben Patienten feststellen. So zeigten Plasmaproben bei gleichen Allergenkonzentrationen eine deutlich niedrigere IgE-Allergen-Komplexbindung als Serumproben. Aus diesem Grund wurde von einer Verwendung von Indikatorplasma in weiteren Versuchen abgesehen. Bezüglich der einzusetzenden Allergenmenge ließ sich für Bet v 1 eine optimale Konzentration von 2,5 µg/ml ermitteln. Bei dieser Konzentration zeigte sich die höchste IgE-Allergen-Komplexbindung (Abb. 7 B). Des Weiteren wurde die Entwicklungszeit der Platte bis zum Abstoppen der Farbreaktion angepasst. Sie betrug beim hier verwendeten Indikatorserum 8 min (Daten nicht gezeigt).

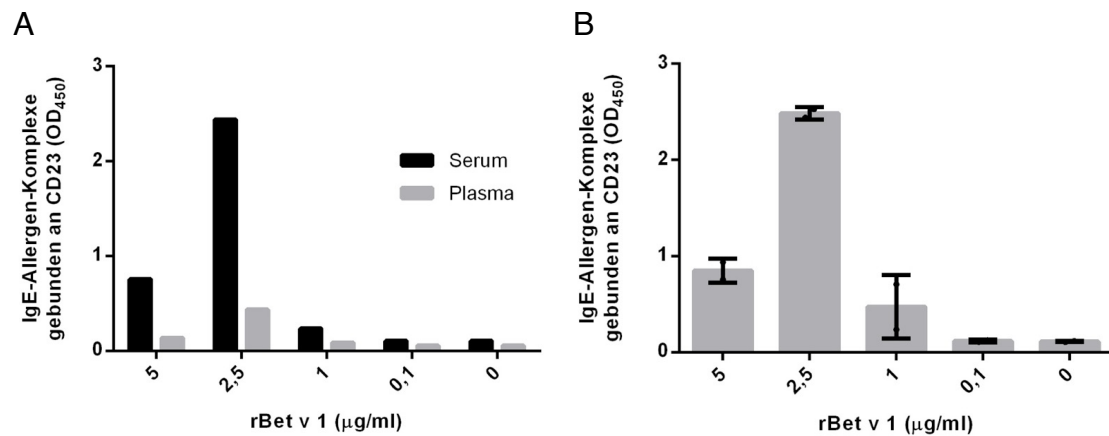


Abbildung 7: Vergleich von Indikatorserum und Indikatorplasma sowie optimale Allergenkonzentration im Bet v 1-spezifischen ELIFAB. Im direkten Vergleich zeigt der Einsatz von Indikatorplasma und -serum derselben Blutprobe eine große Differenz in der jeweiligen gemessenen Absorption (A). Als optimale Bet v 1-Konzentration erwiesen sich für das in dieser Arbeit verwendete Indikatorserum 2,5 µg/ml (B). Die angegebenen Standardabweichungen repräsentieren Inter-Assay Abweichungen von zwei unabhängigen Messungen.

5.1.1.2 Api m 1

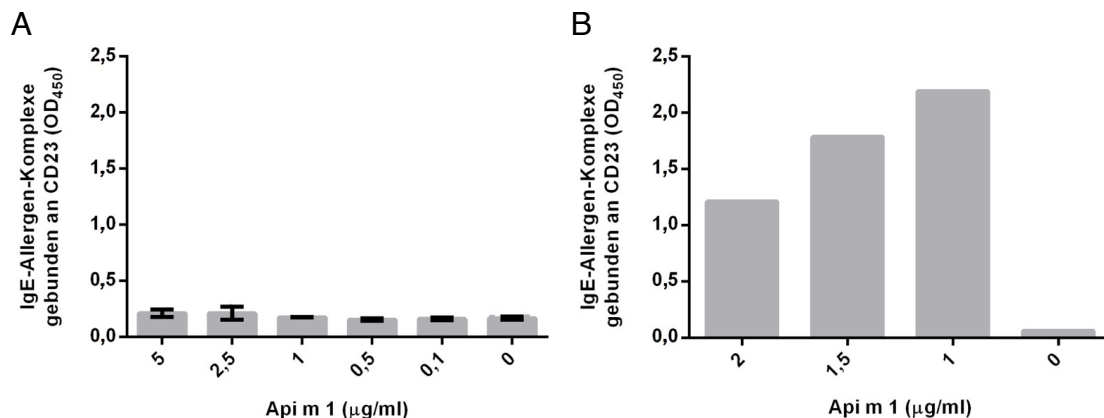
Auf die Erkenntnisse aus der Etablierung des Bet v 1-spezifischen ELIFAB Assays aufbauend, wurde mit der Entwicklung des Assays für die Hymenopterengiftallergene Api m 1 (Bienengift) und Ves v 5 (Wespengift) begonnen. Als potentiell Indikatorserum für den Api m 1-ELIFAB wurde das Serum eines Bienengiftallergikers getestet, das einen Api m 1-spezifischen IgE-Wert von 289,5 kUA/l aufwies. Entgegen der Erwartungen konnte jedoch im Assay keine Absorption und damit IgE-Allergen-Komplexbindung gemessen werden, die sich von der Negativ-Kontrolle (kein Allergen wird hinzugefügt) unterscheiden ließ (Abb. 8 A).

Aufgrund der Vermutung, dass die Ursache in potentiell blockierenden allergenspezifischen IgG-Antikörpern im Serum bestand, wurde das enthaltene IgG vollständig mittels Protein-G-Sepharose depletiert (Tabelle 5). Bei Verwendung des depletierten Serums im Assay bestätigte sich diese Vermutung. Die Komplexbildung und -bindung von Api m 1-spezifischem IgE und Allergen durch CD23 wurde nicht weiter beeinflusst und es konnte für den Api m 1-ELIFAB eine optimale Allergenkonzentration von 1 µg/ml ermittelt werden (Abb. 8 B). Die Entwicklungszeit wurde auf 6 min angepasst (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 5: Api m 1-spezifische Antikörper (AK)-Konzentrationen vor und nach Depletion von IgG.

Nach insgesamt 9 Depletionsvorgängen war kein Api m 1-spezifisches IgG mehr nachzuweisen. Gleichzeitig zeigte sich auch ein Rückgang der Api m 1-spezifischen IgE-Konzentration im Serum. Ursache für diesen mit jedem Depletionsvorgang zunehmenden unspezifischen Verlust sind u.a. Dilutionseffekte der Pufferlösungen und unspezifische Bindung von IgE-AK. Trotzdem konnte eine hohe Api m 1-spezifische IgE-Konzentration erhalten werden.

	vor Depletion	nach Depletion
slgE Api m 1	287,5 kUA/l	195,6 kUA/l
slgG Api m 1	70,2 mgA/l	nicht nachweisbar
slgG4 Api m 1	>30 mgA/l	nicht nachweisbar

**Abbildung 8: ELIFAB-Absorptionswerte eines potentiellen Api m 1-Indikatorserums vor und nach Depletion von allergenspezifischem IgG.**

Ein mit einer Api m 1-spezifischen IgE-Konzentration von 287,5 kUA/l potentiell geeignetes Indikatorserum zeigte im ELIFAB keinen Unterschied zur Negativkontrolle. Die angegebenen Standardabweichungen repräsentieren Inter-Assay Abweichungen von zwei unabhängigen Messungen (A). Nach Depletion sämtlicher IgG-Antikörper konnte im ELIFAB eine sich deutlich von der Negativkontrolle abhebende Absorption detektiert werden (B). Als optimale Api m 1-Konzentration erwies sich 1 µg/ml.

5.1.1.3 Ves v 5

Auch beim Test eines potentiell geeigneten Indikatorserums für den Ves v 5-ELIFAB mit einer spezifischen IgE-Konzentration von 464 kUA/l (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thilo Jakob, Klinik für Dermatologie und Allergologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) konnte keine IgE-Allergen-Komplexbindung detektiert werden. Analog zu den Erkenntnissen der Versuche mit Api m 1 (vgl. 5.1.1.2) war es jedoch durch die Depletion der IgG-AK möglich, eine deutliche IgE-Allergen-Komplexbindung

auszulösen (Tabelle 6 und Abb. 9). Die optimale Konzentration von Ves v 5 konnte für dieses Indikatorserum mit 3 µg/ml ermittelt werden (Abb. 9).

Da die IgE-Allergen-Komplexbindung im hier verwendeten Indikatorserum geringer ausfiel, ergab sich mit 15 min auch eine längere Entwicklungszeit (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6: Ves v 5-spezifische Antikörperkonzentrationen vor und nach Depletion von IgG. Die vollständige Depletion von IgG-AK führte auch hier zu einem gewissen Verlust an IgE-AK (vgl. Tabelle 5). Es wurden 7 Depletionsvorgänge durchgeführt.

	vor Depletion	nach Depletion
slgE Ves v 5	464 kUA/l	100,2 kUA/l
slgG Ves v 5	9,09 mgA/l	nicht nachweisbar
slgG4 Ves v 5	1,01 mgA/l	nicht nachweisbar

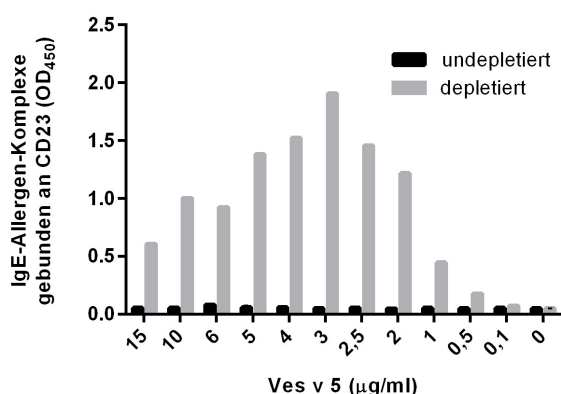


Abbildung 9: ELiFAB-Absorptionswerte eines potentiellen Ves v 5-Indikatorserums vor und nach Depletion von allergenspezifischem IgG. Erst nach vollständiger Depletion allergenspezifischen IgGs wurde eine sich deutlich von der Negativkontrolle abhebende Absorption gemessen. Die optimale Allergenkonzentration des Ves v 5-spezifischen ELiFAB lag im Fall des hier verwendeten Indikatorserums bei 3 µg/ml.

5.1.2 Validierung der allergenspezifischen Assays

5.1.2.1 Api m 1-ELiFAB

Um die Validität des Api m 1-spezifischen ELiFAB Assays zu prüfen, wurden die Seren fünf gesunder Kontrollen ohne Nachweis Api m 1-spezifischer IgE-AK als Testseren herangezogen. Dabei zeigte sich eine durchgehende Übereinstimmung mit der Positivkontrolle, die Abweichungen betragen durchschnittlich 3,97 % (Abb. 10 A).

5.1.2.2 Ves v 5-ElIFAB

Die gleichen fünf gesunden Kontrollen, bei denen auch keine Ves v 5-spezifischen IgE-AK nachweisbar waren, wurden zur Validierung des Ves v 5-spezifischen ElIFAB herangezogen. Auch hier konnte trotz kleiner Abweichungen von der Positivkontrolle (durchschnittlich 7,98 %) keine blockierende Aktivität detektiert werden (Abb. 10 B). Der Ves v 5-spezifische ElIFAB Assay ist somit zur Messung allergenspezifischer blockierender Aktivität geeignet.

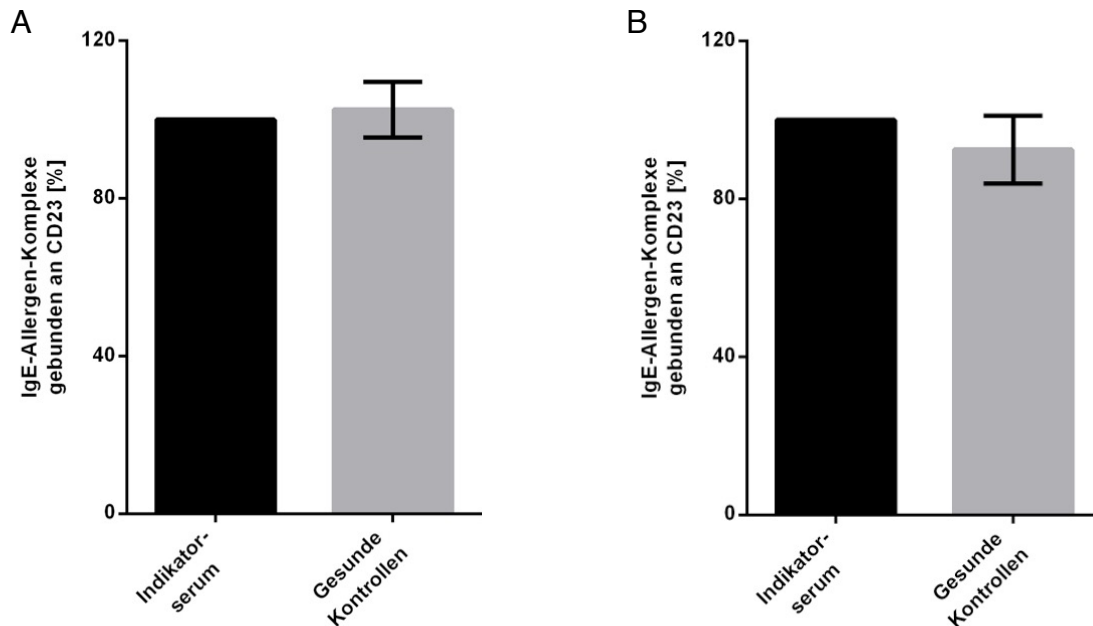


Abbildung 10: Validierung der allergenspezifischen ElIFAB Assays durch fünf nicht-atopische Kontrollen. Die Abweichungen zur Positivkontrolle (RPMI statt Testserum) betragen durchschnittlich 3,97 % im m 1-spezifischen ElIFAB (A) sowie 7,98 % im Ves v 5-spezifischen ElIFAB (B).

5.1.3 Blockierende Aktivität vor und unter allergenspezifischer Immuntherapie bei Birkenpollenallergikern

Stichprobenartig wurden die Testseren von zwei Birkenpollenallergikern ausgewählt und die blockierende Aktivität zum Zeitpunkt m0 (vor AIT mit Birkenpollenextrakt) sowie m36 (nach 36 Monaten AIT) mit dem ElIFAB Assay geprüft (Abb. 11 A). Dabei zeigte sich zum Zeitpunkt m0 keine Einschränkung der Bildung von IgE-Bet v 1-Komplexen im Sinne blockierender Aktivität. Im Vergleich zur Positivkontrolle konnte eine ähnliche Zahl von gebundenen IgE-Bet v 1-Komplexen beobachtet werden. Zum Zeitpunkt m36 hingegen ließ sich eine deutliche Minderung der gebundenen IgE-Bet v 1-Komplexe feststellen. Die blockierende Aktivität hat dabei unter der Therapie um durchschnittlich 54,82 % zugenommen.

Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie mit einem deutlich größeren Kollektiv von Pollenallergikern, die gegenüber Lieschgraspollen sensibilisiert waren (Shamji et al. 2013). Gleichzeitig stimmt die EliFAB-Messung auch mit zuvor im IgE-blocking factor Assay bzw. dem Goldstandard IgE-FAB Assay ermittelten Daten der gleichen Patienten überein (Abb. 11 B).

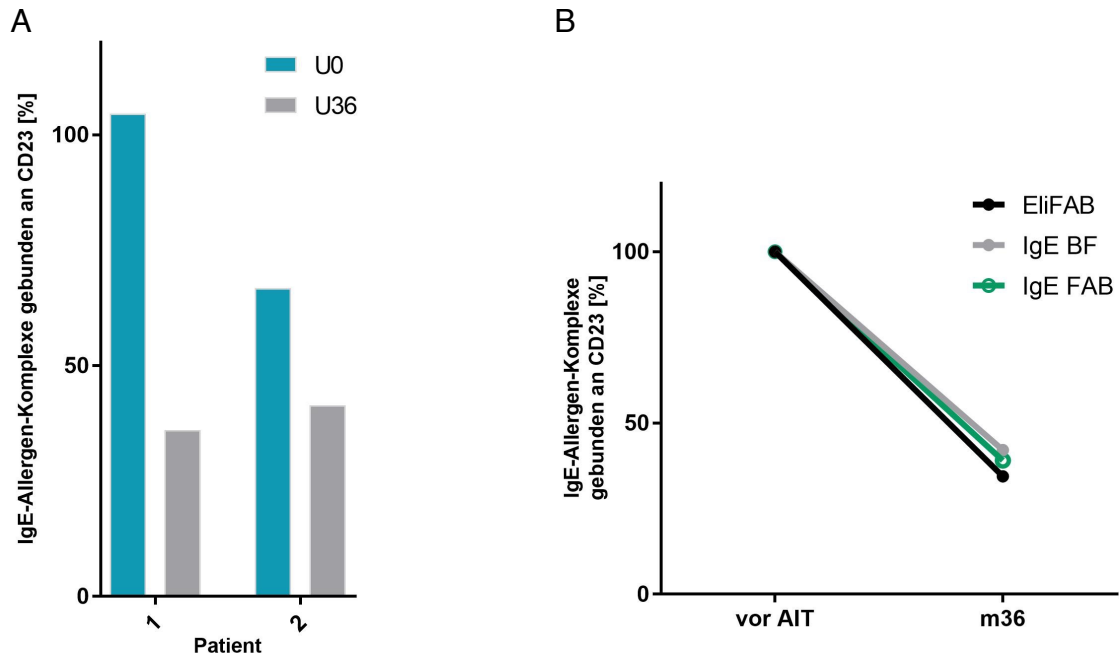


Abbildung 11: Blockierende Aktivität in zwei Birkenpollenallergikerseren vor und nach allergenspezifischer Immuntherapie (AIT). Als Folge der AIT kam es bei den beiden ausgewählten Birkenpollenallergikern zu einer Reduktion der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen durch CD23 von durchschnittlich 54,82 % (A). Diese Ergebnisse entsprechen den Messungen mit dem IgE-blocking factor Assay bzw. dem Goldstandard IgE-FAB Assay. Dargestellt ist die mit allen drei Assays erfasste repräsentative Entwicklung blockierender Aktivität bei einem der beiden Patienten (B).

5.2 EliFAB-Messung der Patientenkollektive der Bienen- und Wespengiftallergiker

5.2.1 Blockierende Aktivität im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie

Bereits wenige Tage nach Beginn der Einleitungsphase der AIT mit Bienen- bzw. Wespengift konnte im EliFAB Assay eine Veränderung der blockierenden Aktivität in den Patientenseren detektiert werden. So zeigte sich teilweise schon in nach acht Tagen gewonnenen Serumproben eine verminderte IgE-Allergen-Komplexbindung im EliFAB.

Bei allen Patienten fand sich dieser Effekt spätestens in drei Wochen nach Einleitung der AIT gewonnenen Proben (Abb. 12 A).

Um eine Vergleichbarkeit der Veränderung blockierender Aktivität zwischen verschiedenen Patienten zu ermöglichen, wurde die Absorption der jeweils ersten gemessenen Probe (Zeitpunkt U0, vor Therapie) auf 100 % gesetzt. Auf diesen Ausgangswert bezogen zeigte sich 3 Wochen nach AIT-Beginn im Median eine Zunahme der blockierenden Aktivität um 73,07 %.

Bei der direkten Gegenüberstellung der gemessenen Absorptionen von Bienen- und Wespengiftallergikern stellte sich ein erheblicher Unterschied in der Ausprägung der blockierenden Aktivität vor Einleitung der AIT dar. So wiesen die Bienengiftallergiker des Ultra Rush-Kollektivs bereits vor Therapie eine erheblich höhere blockierende Aktivität als die gegenüber Wespengift sensibilisierten Patienten dieses Kollektivs auf (Abb. 13). Trotz der bereits sehr hohen blockierenden Aktivität vor der Einleitung konnte im zeitlichen Verlauf eine weitere Steigerung beobachtet werden. Prozentual entsprechen diese Veränderungen bei Bienengiftallergikern sogar denen bei Wespengiftallergikern. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 12 (A) verdeutlicht, in der die gemessene Absorption der jeweils vor Therapie gewonnenen Probe auf 100 % gesetzt wurde. Sowohl bei Bienen- als auch bei Wespengiftallergikern zeigte sich spätestens in der Serumprobe 3 Wochen nach Beginn der AIT eine prozentual vergleichbare Abnahme der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen im EliFAB.

Beim Vergleich der Verläufe von allergenspezifischer IgG4-Konzentration und den Ergebnissen des EliFAB zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl gebundener IgE-Allergen-Komplexe im allergenspezifischen EliFAB und der allergenspezifischen IgG4-Konzentration (Abb. 12 B). Im Beobachtungszeitraum fand also ein gleichzeitiger Anstieg von IgG4-Konzentration und blockierender Aktivität im Serum statt.

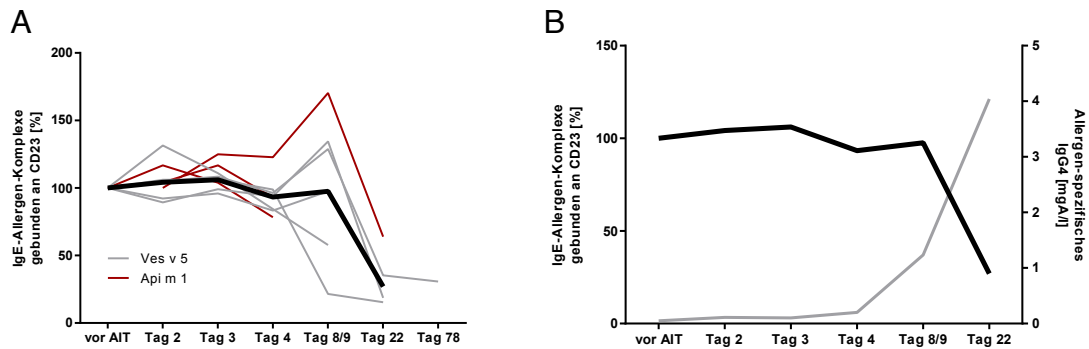


Abbildung 12: Inhibition der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen durch CD23 und allergenspezifische IgG4-Konzentration im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT). Die jeweils vor Beginn der Therapie bestimmte blockierende Aktivität ist auf 100 % gesetzt. Im Verlauf lässt sich so eine therapiebedingte Erhöhung der blockierenden Aktivität frühestens ab dem 8./9. Tag nach Einleitung der AIT beobachten (A). In 3 Wochen nach Beginn der AIT gewonnenen Serumproben zeigte sich im Median bereits eine Reduktion der gebundenen IgE-Allergen-Komplexe um 73,07 %. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl gebundener IgE-Allergen-Komplexe im allergenspezifischen EliFAB und der im Serum gemessenen allergenspezifischen IgG4-Konzentration (B). Dargestellt sind die Messergebnisse eines repräsentativen Patienten.

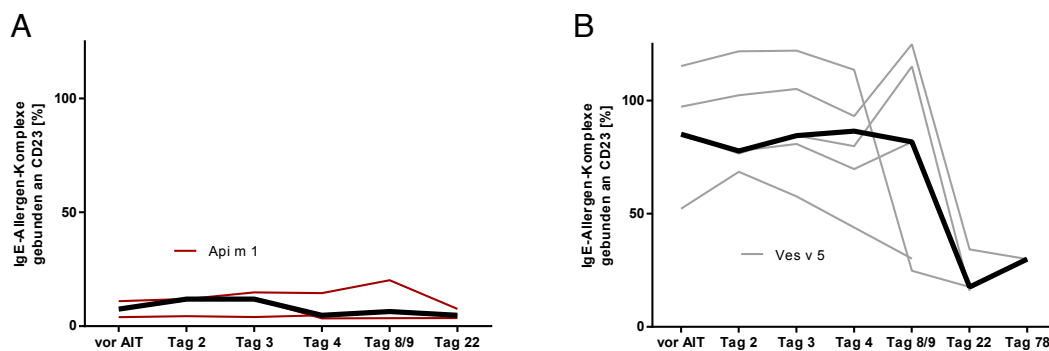


Abbildung 13: Unterschiede in der Ausprägung blockierender Aktivität in Seren Api m 1- bzw. Ves v 5-allergischer Patienten im frühen Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT). Bei Bienengiftallergikern zeigte sich bereits vor Beginn der AIT eine sehr hohe blockierende Aktivität, die unter Therapie noch zunahm (A). Dementgegen wiesen die gegenüber Wespengift sensibilisierten Patienten vor Therapie kaum oder gar keine blockierende Aktivität auf (B). Prozentual konnten ähnlich hohe Veränderungen blockierender Aktivität in den beiden Kollektiven beobachtet werden (vgl. Abb. 12).

5.2.2 Blockierende Aktivität vor Therapie

Um die vor Einleitung einer Ultra Rush-AIT im EliFAB beobachteten Unterschiede zwischen Bienen- und Wespengiftallergikern in einem größeren Kollektiv zu prüfen, wurden zehn weitere Probanden mit Bienengift- und neun weitere mit Wespengiftallergie untersucht. Zusammen mit den vor Einleitung der AIT im Ultra Rush-Kollektiv gewonnenen Proben bilden sie die Patientenkollektive „Bienengiftallergiker vor AIT“ bzw. „Wespengiftallergiker vor AIT“ (vgl. Abb. 4).

Die in der Folge im EliFAB gewonnenen Ergebnisse bestätigten, dass in Patientenseren von Api m 1-Allergikern im Vergleich zu Ves v 5-Allergikern eine wesentlich geringere IgE-Allergen-Komplexbildung ausgelöst werden konnte. Dies weist auf eine AIT-unabhängige vorbestehende blockierende Aktivität bei den Bienengiftallergikern hin (Abb. 14). Dementgegen konnte in den Testseren der gegenüber Ves v 5 sensibilisierten Patienten nahezu keine blockierende Aktivität vor Therapie nachgewiesen werden. Die Analyse der jeweiligen Sozialanamnese zeigte diesbezüglich, dass nahezu alle gegenüber Api m 1 sensibilisierten Patienten beruflich oder in Form einer Freizeitaktivität der Imkerei nachgingen bzw. in unmittelbarer Umgebung von Imkern lebten (Tabelle 3), was mit einer höheren Zahl an (oft regelmäßigen) Stichereignissen einherging. Auf diesen Zusammenhang wird in Kapitel 6.2.2 näher eingegangen.

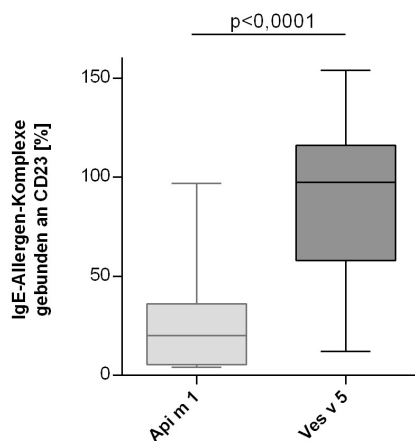


Abbildung 14: Ausprägung blockierender Aktivität in Seren Api m 1- bzw. Ves v 5-allergischer Patienten vor Beginn der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT). Vor Einleitung der AIT zeigte sich bei den eingeschlossenen Wespengiftallergikern im EliFAB eine signifikant höhere Zahl gebundener IgE-Allergen-Komplexe im Vergleich zu den Bienengiftallergikern.

5.2.3 Blockierende Aktivität vor und nach Stichprovokation unter AIT

Zum Zeitpunkt der durchschnittlich 17 Monate nach Einleitung der AIT durchgeführten Stichprovokation zeigte sich in den Patientenseren eine ausgeprägte blockierende Aktivität (Abb. 15). Von den insgesamt 20 analysierten Seren (14 Ves v 5-, 6 Api m 1-sensibilisierte Patienten) fielen jedoch zwei durch keine im EliFAB Assay detektierbare blockierende Aktivität auf. Trotzdem konnte bei keinem Patienten durch die Stichprovokation eine allergische Reaktion ausgelöst werden, sodass bei allen Patienten auf eine Toleranzinduktion geschlossen wurde.

Weder einen Tag noch 3-8 Wochen nach Stichprovokation konnten signifikante Veränderungen der blockierenden Aktivität im Vergleich zu den Werten vor Stichprovokation festgestellt werden (Abb. 15).

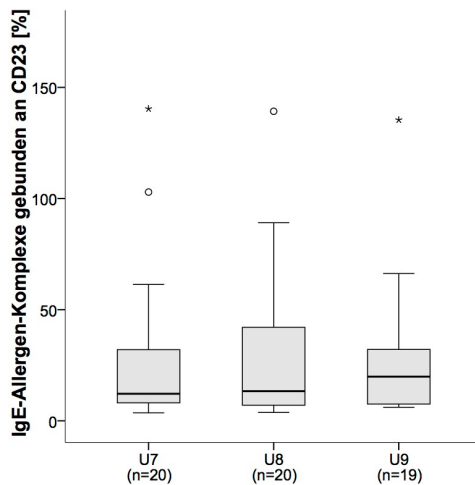


Abbildung 15: Anzahl an CD23 gebundener IgE-Allergen-Komplexe unmittelbar vor (U7), einen Tag (U8) und 3-8 Wochen im Verlauf (U9) nach Stichprovokation. Infolge der allergenspezifischen Immuntherapie zeigte sich bereits zum Zeitpunkt der Stichprovokation eine sehr geringe Bindung von IgE-Allergen-Komplexen durch CD23. Dieses Niveau blieb unmittelbar nach der Stichprovokation sowie im weiteren Verlauf unverändert.

5.2.4 Quantitative und qualitative Veränderungen der spezifischen humoralen Komponenten infolge der allergenspezifischen Immuntherapie

Um einen Überblick der langfristigen Auswirkungen der AIT auf die humorale Komponente des Immunsystems von Hymenopterengiftallergikern zu erhalten, wurden aus der Gesamtheit der Wespengiftallergiker die drei Kollektive „Wespengiftallergiker vor AIT“, „unter AIT“ (Zeitpunkt der Stichprovokation) und „nach AIT“ (5-12 Jahre nach Ende der Therapie) gebildet (vgl. Tabelle 3). Neben Veränderungen der Ves v 5-spezifischen Konzentrationen von IgE und IgG4 konnte in der Folge auch die Höhe der blockierenden Aktivität zu allen drei Zeitpunkten bestimmt werden.

Dabei zeigte sich im Kollektiv der Wespengiftallergiker, deren AIT bereits vor 5-12 Jahren abgeschlossen war, eine signifikant niedrigere Konzentration des Ves v 5-spezifischen IgEs verglichen mit Messwerten bei Patienten vor Beginn der AIT (Abb. 16 A). Als Zeichen einer effektiven Therapie fanden sich unter AIT signifikant höhere Werte der Ves v 5-spezifischen IgG4-AK (Abb. 16 B). Beim Patientenkollektiv nach AIT unterschied sich diese Konzentration jedoch nicht mehr signifikant vom Niveau von Patienten vor Therapie. Ferner konnten therapiebedingt geringere allergenspezifische IgE/IgG4-Quotienten beobachtet werden (Abb. 16 C). Diese zeigten sich im Gegensatz zu

den jeweiligen Konzentrationen von allergenspezifischem IgE und IgG4 noch Jahre später signifikant reduziert.

In gleicher Art wie die allergenspezifischen IgG4-Konzentrationen verhielt sich die Ausbildung blockierender Aktivität in den Patientenseren (Abb. 17). So konnte eine signifikante Erhöhung blockierender Aktivität während der AIT gemessen werden. Bei Patienten 5-12 Jahre nach Ende der AIT war diese im Median jedoch nicht mehr nachweisbar (Abb. 17 A).

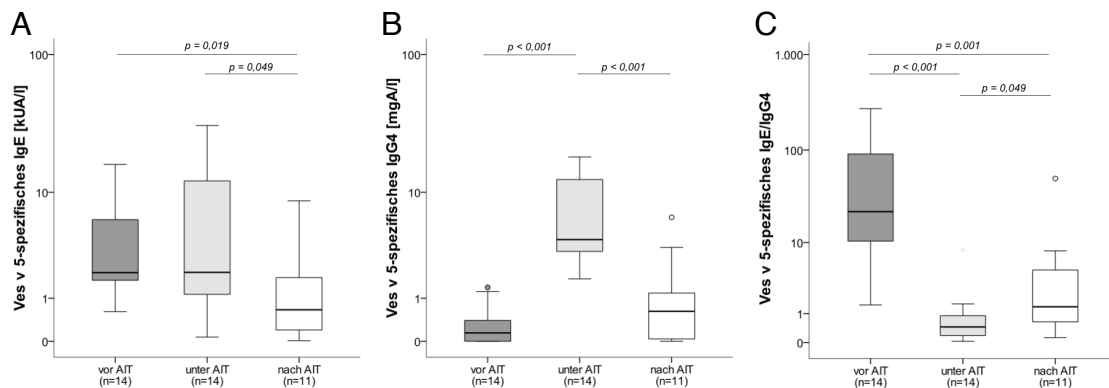


Abbildung 16: Quantitative humorale Veränderungen unter allergenspezifischer Immuntherapie (AIT). Langfristig vermindert die AIT allergenspezifisches IgE in Patientenseren (A). Unter der Therapie kommt es zudem zur Ausbildung allergenspezifischer IgG4-Antikörper, durchschnittlich neun Jahre nach Ende der AIT ist dieser Effekt jedoch nicht mehr signifikant nachweisbar (B). Es resultiert allerdings ein auch Jahre nach AIT noch feststellbarer verminderter allergenspezifischer IgE/IgG4-Quotient (C).

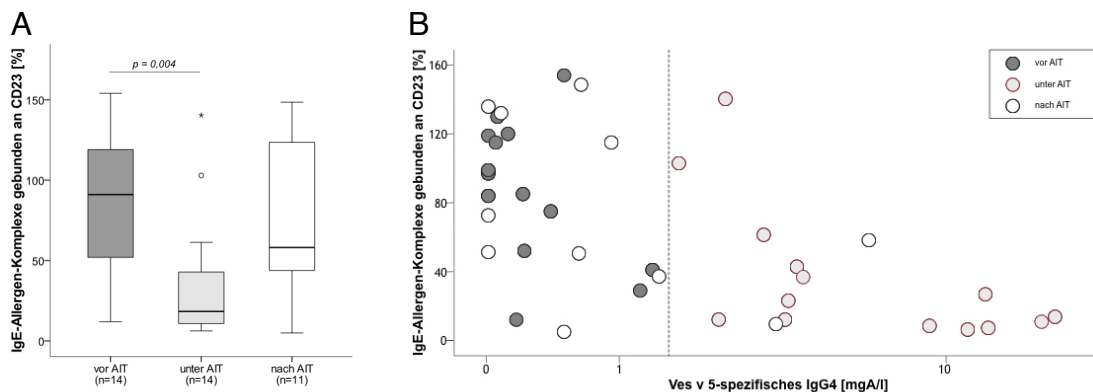


Abbildung 17: Qualitative humorale Veränderungen unter allergenspezifischer Immuntherapie (AIT). Unter AIT kommt es zur Ausbildung einer starken Inhibition der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen (A). Das Niveau blockierender Aktivität durchschnittlich neun Jahre nach Therapie unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von Messwerten vor Therapie. Die Darstellung der Messdaten der einzelnen Patienten aller drei Kollektive verdeutlicht die geringen Unterschiede in blockierender Aktivität und Ves v 5-spezifischer IgG4-Konzentration zwischen Patienten vor AIT und 5-12 Jahre nach Ende der AIT (B). Dementgegen lassen sich Patienten unter AIT anhand erhöhter blockierender Aktivität und Ves v 5-spezifischer IgG4-Konzentration abgrenzen (*two-tailed Spearman's rank correlation coefficient*: $r_s = -0.611$, $P < 0.0001$).

5.2.5 Stichreaktionen nach Feldstich

Das Patientenkollektiv „Feldstich“ beinhaltete Patienten, die nach Ende der AIT erneut von dem ursprünglich allergieauslösenden Insekt gestochen worden waren (vgl. Tabelle 3). Diese wurden auf mögliche Unterschiede zwischen erneut allergisch reagierenden und gegenüber dem Feldstich nach wie vor toleranten Patienten untersucht. Hierfür wurde die blockierende Aktivität der jeweiligen Seren im Api m 1- bzw. Ves v 5-spezifischen EliFAB Assay gemessen. Bei den einen Feldstich ohne systemische Reaktion tolerierenden Patienten zeigte sich dabei im Vergleich der jeweiligen Mediane eine niedrigere Zahl gebundener IgE-Allergen-Komplexe, was auf eine höhere blockierende Aktivität in diesem Teil der Gruppe schließen lässt (Abb. 18). Aufgrund der geringen Patientenzahl war eine statistische Auswertung jedoch nicht möglich.

An dieser Stelle ist zudem anzumerken, dass die im Kollektiv „Feldstich“ eingeschlossenen Wespengiftallergiker nicht alle ausschließlich gegenüber Ves v 5 sensibilisiert sind. Bei drei Patienten, darunter zwei, die einen Feldstich nicht tolerierten, konnte anhand der spezifischen IgE-Konzentrationen eine vermehrte Sensibilisierung gegenüber dem zweiten Majorallergen der Wespe, Ves v 1, gefunden werden (Tabelle 7).

Detaillierte Ergebnisse der Patientenbefragung bei erlebten Feldstichen sowie die mit dieser Form der Datenerhebung einhergehenden Einschränkungen der Objektivität zeigt Tabelle 8 auf.

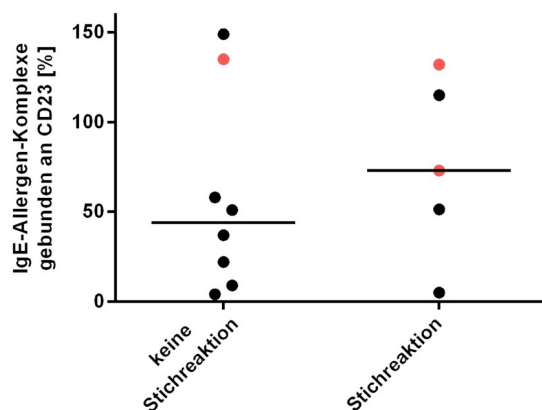


Abbildung 18: Inhibition CD23-gebundener IgE-Allergen-Komplexe bei Toleranz und fehlender Toleranz eines Feldstichs. Im Serum der den Feldstich ohne systemische Reaktion tolerierenden Patienten zeigt der berechnete Median eine höhere blockierende Aktivität. Rot markiert sind Wespengiftallergiker mit einer möglichen klinisch relevanten Sensibilisierung gegenüber Ves v 1, welche aus den allergenspezifischen IgE- bzw. IgG4-Konzentrationen hervorgeht (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Allergenspezifische Antikörper(AK)-konzentrationen des Kollektivs „Feldstich“. Die Spalte „EliFAB“ enthält die prozentuale Anzahl CD23-gebundener IgE-Allergen-Komplexe in Relation zur Positivkontrolle. Gelb markiert sind die drei möglicherweise isoliert gegenüber Ves v 1 immunologisch reagierenden Patienten. Grund für diese Annahme sind erhöhte Ves v 1-spezifische IgE- und IgG4-AK, während die jeweiligen Ves v 5-spezifischen AK-Konzentrationen nach den Kriterien des ImmunoCap unterhalb der klinisch relevanten Grenze liegen.

Wespengiftallergiker

Patient	Stichreaktion	EliFAB (%)	slgE Ves v 5 (kUA/l)	slgE Ves v 1 (kUA/l)	slgG4 Ves v 5 (mgA/l)	slgG4 Ves v 1 (mgA/l)
P3	ja	132	0,01	0,52	0,08	0,81
P5	ja	73	0,05	4	0	8,56
P23	ja	115	0,33	0,22	0,92	1,28
P35	ja	51	0,5	0,55	0	0,12
P57	ja	5	2,2	0,07	0,5	0,45
P4	nein	149	0,66	1,33	0,64	1,36
P9	nein	51	2,37	1,1	0,62	3,69
P26	nein	58	8,59	0,76	6,35	0,72
P29	nein	37	1,43	0,48	1,46	0,87
P52	nein	9	0,72	0,79	3,53	1,72
P53	nein	135	0,08	0,8	0	0,55

Bienengiftallergiker

Patient	Stichreaktion	EliFAB (%)	slgE Api m 1 (kUA/l)	slgG4 Api m 1 (mgA/l)
P28	nein	4	2,01	0,3
P50	nein	22	3,24	1,48

Tabelle 8: Patientenangaben zu Stichreaktionen bei Feldstichen nach abgeschlossener allergenspezifischer Immuntherapie. Aufgrund der subjektiven Angaben ist bei Patient 23 eine psychogene Ursache der Symptome nicht auszuschließen. Bei Patient 57 könnte eine klinisch relevante Sensibilisierung gegenüber einem unbekannten Insekt die fehlende Toleranz von Wespenstichen hervorgerufen haben.

Patient	Allergie-auslösende Hymenopterenart	Feldstich durch (Anzahl der Stiche)	sichere Identifikation des Insekts	Symptome	Notfall-Set eingesetzt	Ärztliche Behandlung
P3	Wespe	Wespe (2 bei 2 Ereignissen)	ja	großflächige Schwellung (>10cm), Schwindel, Übelkeit, Atemschwierigkeiten		ja (nur 2. Stich)
P5	Wespe	Wespe (2 bei 2 Ereignissen)	ja	großflächige Schwellung (>10cm), Urtikaria, Schwindel, Übelkeit/ Atemschwierigkeiten/ Herzrasen, Bewusstlosigkeit (nur bei 1. Stich)		Klinik bzw. Hausarzt
P23	Wespe	Wespe (10 bei 1 Ereignis)	ja	großflächige Schwellung (>10cm), Schwindel	ja	ja

P35	Wespe	Wespe (2 bei 1 Ereignis)	ja	Schwindel, Harn- und Stuhldrang, Übelkeit/ Atemschwierigkeiten/ Herzrasen	ja	ja
P57	Wespe	möglicher- weise andere Art, unbekannt	ja	Schwindel, Übelkeit, Herzrasen, Bewusstlosigkeit	ja	ja

6 Diskussion

6.1 Etablierung des EliFAB Assays

Die spezifischen humoralen Komponenten als Teil der immunmodulatorischen Wirkung der AIT rückten bereits früh ins Zentrum intensiver Forschungsbemühungen. Zahlreiche Studien konnten jedoch keine Korrelation quantitativer AK-Konzentrationen und klinischer Parameter finden (Bodtger et al. 2005, Ewan et al. 1993, Lerch und Müller 1998, Müller et al. 1989). In den letzten Jahren hat sich insbesondere durch die Etablierung des IgE-FAB Assays eine neue Theorie durchgesetzt. So postulierten Wachholz und Durham, dass diese neue qualitative Messung von Effekten blockierender AK größere Relevanz bei der Korrelation mit klinischen Erfolgsparametern zeige (Wachholz und Durham 2004). Tatsächlich bestätigen erste Ergebnisse von Studien mit Gräserpollenallergikern diese These, woraus vielversprechende Möglichkeiten für die Suche nach einem Erfolgsparameter der AIT erwachsen. Ein solcher Erfolgsparameter ist insbesondere für Hymenopterengiftallergiker von großer Bedeutung. Hier können bisher nur eine Stichprovokation oder ein Feldstich Aufschluss über den aktuellen Schutz vor einer systemischen Reaktion geben.

Während eine wachsende Zahl von Studien unter Einsatz des IgE-FAB Assays die blockierende Aktivität bei Pollenallergikern dokumentiert, ist der Einfluss blockierender AK bei Hymenopterengiftallergikern jedoch noch weitgehend unerforscht. Ein Grund dafür kann auch in der eingeschränkten Praktikabilität des IgE-FAB Assays gesehen werden. Lange Inkubationszeiten für EBV-transformierte B-Zelllinien und die Auswertung via Durchflusszytometrie machen das Verfahren fehleranfällig, teuer und zeitaufwendig.

An dieser Stelle könnte das EliFAB Assay als Alternative zum IgE-FAB Assay neue Standards in Reproduzierbarkeit, Skalierbarkeit, Kosten- und Zeitaufwand setzen (Shamji et al. 2013). In ersten Versuchen konnten Shamji et al. zeigen, dass Sensitivität und Spezifität des EliFAB dem Gold-Standard IgE-FAB ebenbürtig sind. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit für die qualitativen Messungen der humoralen Veränderungen unter AIT mit Hymenopterengiften die Etablierung des EliFAB gewählt.

Zentraler Bestandteil des EliFAB Assays ist ein geeignetes Indikatorserum, das sich durch eine hohe Konzentration allergenspezifischen IgEs auszeichnet. Mit dem während der Inkubationsphase zugefügten Allergen entstehen IgE-Allergen-Komplexe, deren Bildung und spätere Bindung an CD23 durch blockierende IgG-AK inhibiert werden kann. Bei der Etablierung des IgE-FAB Assays haben sich Indikatorseren bewährt, die eine allergenspezifische IgE-Konzentration von mindestens 50 kUA/l

aufweisen (Francis 2008). Aufgrund erster vorliegender Daten zur Anwendung des EliFAB Assays bei Birkenpollenallergikern (Shamji et al. 2013) wurde die beschriebene Konzentrationsabhängigkeit innerhalb dieser Arbeit zunächst im Rahmen der Etablierung eines Bet v 1-spezifischen EliFAB überprüft. In einem ersten Screening-Versuch konnte die Allergen-IgE-Komplexbildung bei drei Seren mit einer jeweiligen allergenspezifischen IgE-Konzentration von ca. 30, 60 und 90 kUA/l getestet werden. Dabei erwiesen sich nur die beiden mindestens 60 kUA/l enthaltenden Seren als geeignet. In einem zweiten Screening-Versuch mit weiteren sieben Patientenseren und unter gleichen Bedingungen bestätigte sich diese Beobachtung. Auch hier hatte nur der Einsatz eines 80,15 kUA/l allergenspezifisches IgE enthaltenden Serums eine ausreichend hohe Absorption im EliFAB zur Folge.

Trotzdem scheint eine Auswahl des Indikatorserums anhand rein quantitativer Gesichtspunkte nicht ausreichend. So zeigte Serum mit einer Bet v 1-spezifischen IgE-Konzentration von ca. 60 kUA/l eine höhere Allergen-IgE-Komplexbindung als Serum mit ca. 90 kUA/l. Folglich könnten die IgE-AK des ersten Serums Allergenmoleküle effektiver gebunden haben. Dies könnte entsprechend der Beobachtungen bei IgG-AK (Shamji et al. 2012, Wachholz und Durham 2004) auf eine unterschiedliche Affinität bzw. Avidität der IgE-AK zurückzuführen sein.

Neben Serum wurde auch potentielles Indikatorplasma getestet. Der Vergleich von Serum und Plasma des gleichen Patienten zeigte, dass Indikatorplasma für die Verwendung im EliFAB Assay ungeeignet ist. Aus welchem Grund diese Unterschiede auftreten bleibt ungewiss, zumal die AK-Konzentrationen durch die unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren nicht beeinflusst werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von P. A. Würtzen (ALK-Abello, Kopenhagen) für den IgE-FAB Assay beschrieben (persönliche Kommunikation).

Beim Test eines potentiellen Indikatorserums für den Api m 1-spezifischen EliFAB zeigte sich ein weiterer Einflussfaktor. Das Serum stammte von einem als Imker tätigen Patienten, woraus sich eine bereits vor Therapie stark erhöhte Konzentration von Api m 1-spezifischen IgG-AK ergab. Diese waren in der Lage, eine Allergen-IgE-Komplexbildung zu inhibieren, was in nur sehr geringen Absorptionsergebnissen im EliFAB resultierte. Nach der vollständigen Depletion der IgG-AK konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Die gleiche Beobachtung konnte bei einem potentiellen Indikatorserum für den Ves v 5-spezifischen EliFAB gemacht werden. Um die gewünschte Eigenschaft einer hohen Allergen-IgE-Komplexbildung im jeweiligen potentiellen Indikatorserum zu optimieren, kann es folglich sinnvoll sein, bereits bestehende IgG-AK zu depletieren. Auf diese Weise wäre es bei Bedarf auch möglich, Seren von bereits therapierten Patienten einzusetzen, die AIT-induzierte IgG-AK aufweisen. Zu beachten ist allerdings die

mit jedem Depletionsvorgang ebenfalls abnehmende IgE-Konzentration. Neben unspezifischer Bindung sind hier vor allem Dilutionseffekte durch zahlreiche Waschvorgänge als Ursache zu sehen. Auch nach der Depletion sollte eine Mindestkonzentration von 60 kUA/l allergenspezifischen IgEs vorliegen.

Die optimale Bindung von Allergen-IgE-Komplexen an CD23 auf EBV-transformierten B-Zellen im IgE-FAB bzw. direkt auf der Reaktionsplatte im EliFAB zeigte sich in vorangegangenen Untersuchungen beim Einsatz geringer Allergenkonzentrationen (Shamji et al. 2006, Wachholz et al. 2003). Dies konnte innerhalb dieser Arbeit bei allen drei etablierten allergenspezifischen EliFAB Assays bestätigt werden. Die Ursache für diese Beobachtung ist dabei in der limitierten Anzahl von Bindungsstellen der IgE-AK zu sehen. Nur bei geringen Allergenkonzentrationen binden multiple IgE-AK an ein Allergenmolekül. Auf diese Weise entstehen große Allergen-IgE-Komplexe die von CD23 auf B-Zellen bzw. auf der Reaktionsplatte selektiv gebunden werden.

Es fiel auf, dass einzelne Messergebnisse des EliFAB über der durch die Positivkontrolle definierten 100 %-Marke lagen. Dies lässt sich durch mit den Testseren zusätzlich eingebrachte allergenspezifische IgE-AK erklären. Zusätzlich zu den bereits im Indikatorserum enthaltenen IgE-AK scheinen diese eine weitere Komplexierung von Allergen und IgE zu ermöglichen und haben somit eine höhere Anzahl gebundener Allergen-IgE-Komplexe im EliFAB zur Folge verglichen mit dem alleinigen Indikatorserum. Werte unter 100 % der Positivkontrolle sind hingegen als Folge blockierender Aktivität in Testseren zu werten.

Durch die zellfreie ELISA-Methode ist der EliFAB Assay deutlich weniger fehleranfällig als der Goldstandard IgE-FAB Assay. Es konnten nur sehr geringe Intra-Assay Abweichungen beobachtet werden. Die Doppelansätze zeigten in der Regel maximale Differenzen im einstelligen Prozentbereich, die auch eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Inter-Assay) nach sich zogen. Der vergleichsweise geringe Zeitaufwand stellt zudem den wohl größten Vorteil des EliFAB dar, die Erhebung großer Datenmengen in kurzer Zeit.

6.2 Blockierende Aktivität von Hymenopterengiftallergikerseren

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl quantitative als auch qualitative humorale Veränderungen infolge einer AIT bei Hymenopterengiftallergikern erfasst. Dabei konnte eine Kausalität zwischen allergenspezifischer IgG4-Konzentration und der Ausbildung

blockierender Aktivität bestätigt und der Zeitpunkt erster humoraler Effekte der Therapie bestimmt werden. In gleicher Weise war es möglich, die Verbindung zwischen einer erfolgreichen Therapie und Veränderungen der spezifischen humoralen Komponenten zu überprüfen und insbesondere die langfristigen Effekte nach Ende der Therapie zu bestimmen.

Testserien von stichprovozierten Patienten vor und nach der Provokation sowie von Patienten mit nach Therapie berichtetem Feldstich ermöglichten eine direkte Korrelation von blockierender Aktivität und der klinischen Reaktion auf den Stich.

6.2.1 Wie früh wirkt die Immuntherapie?

Bei der Therapie der Hymenopterengiftallergie haben sich seit einiger Zeit das Ultra Rush- sowie das Rush-Protokoll gegenüber der konventionellen Aufdosierung durchgesetzt. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen die Sicherheit und Effektivität dieser zeitlich forcierten Einleitungsphasen (Goldberg et al. 2011, Kalogeromitros et al. 2010, Pasaoglu et al. 2006).

Nach inzwischen etablierten internationalen Standards wird innerhalb von zumeist 1-3 Tagen die angestrebte Maximaldosis (MD) von üblicherweise 100 µg des entsprechenden Allergens erreicht. Bei dem hier verwendeten Protokoll schließen sich weitere Injektionen der MD nach einer weiteren Woche, drei Wochen und in der Folge monatlich über fünf Jahre an.

Der Zeitpunkt, an dem infolge der AIT eine Toleranzinduktion und damit der Schutz des Patienten erreicht ist, wird kontrovers diskutiert. Daher wird eine Stichprovokation, welche die einzige Möglichkeit der Überprüfung des Therapieerfolgs darstellt, erst sechs Monate nach Erreichen der MD empfohlen (Przybilla et al. 2011). Zu diesem Zeitpunkt sind 80-90 % der Bienen- und über 95 % der Wespengiftallergiker vor einer erneuten systemischen Reaktion geschützt (Müller 2003). Bei Patienten mit weiterhin positiver Stichreaktion kann die Rate der Therapieversager durch eine Erhöhung der Allergendosis noch weiter reduziert werden (Ruëff et al. 2001). Im Gegensatz zu dem in der Leitlinie empfohlenen Zeitraum liegen Daten von Stichprovokationen zu früheren Zeitpunkten der AIT bisher nur von Goldberg et al. vor (2011). Hier wurde bereits eine Woche nach Therapiestart der Aufbau eines Schutzes *in vivo* bestimmt. Tatsächlich tolerierten 89,1 % der teils nach dem Ultra Rush-Protokoll behandelten Bienengiftallergiker einen Stich, nachdem sie gerade sieben Tage zuvor die MD erreicht hatten. Diese Werte entsprechen den Ergebnissen von Studien, die die Effektivität der Therapie zu späteren Zeitpunkten überprüften (Müller 2003, Ruëff et al. 1996).

Neben dem exakten klinischen Wirkeintritt der Therapie, ist auch der Zeitpunkt eines immunologischen Schutzes bei Hymenopterengiftallergikern bisher kaum untersucht

worden. Mit einer erfolgreichen AIT werden gleich mehrere immunologische Veränderungen verbunden. Dazu gehören erhöhte allergenspezifische IgG-Konzentrationen, insbesondere der Subklasse IgG4, eine Reduktion der Anzahl und der Aktivierung von Basophilen, der Verlust einer Th2-Zell-vermittelten oder Shift dieser hin zu einer Th1-Zell-dominierten Immunantwort (Valenta 2002), erhöhte Konzentrationen von IL-10 sowie die Vermehrung IL-10 produzierender CD4⁺-T-Zellen und Treg-Zellen (Romagnani 2004). Durch die *in vitro*-Erfassung von Veränderungen von Zytokinkonzentrationen und Zellfrequenzen konnten dabei erste Hinweise auf den Entstehungszeitpunkt des Schutzes im frühen Verlauf der Hymenopterenstichspezifischen Immuntherapie gewonnen werden. So zeigten sich bereits wenige Stunden nach Einleitung des Ultra Rush-Protokolls und mit Erreichen der ersten kumulativen MD signifikant erhöhte Konzentrationen von Interferon-gamma (IFN γ)-produzierenden T-Zellen sowie erniedrigte IL-4-Spiegel (Mamessier et al. 2006). In zwei weiteren Studien konnte nach spätestens sieben Tagen eine signifikante Erhöhung der IFN γ -Konzentration und eine signifikante Reduktion der IL-4-Konzentration gefunden werden (Bellinghausen et al. 1997, Jutel et al. 1995).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden in kurzen Zeitabständen innerhalb der nach dem Ultra Rush-Protokoll durchgeführten Einleitungsphase Proben gewonnen. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf den quantitativen und qualitativen Veränderungen von allergenspezifischen IgG4-AK. Bei allen Patienten zeigte sich spätestens 22 Tage nach Einleitung der AIT und damit 20 Tage nach Erreichen der MD ein Anstieg der IgG4-Konzentration. Vereinzelt konnte dieser jedoch bereits am 8.-9. Tag nach Einleitung, also am 6.-7. Tag nach Erreichen der MD, beobachtet werden. Dabei ist zu beachten, dass zwischen dem 8. bzw. 9. und dem 22. Tag nach Einleitung keine weiteren Proben entnommen wurden, sodass sich die Entfaltung eines potentiellen Schutzes durch IgG4-AK in diesem Zeitrahmen abspielen muss. Die quantitative Zunahme der IgG4-Konzentration könnte folglich eine Erklärung für die durch Goldberg et al. bereits nach einer Woche ermittelte Toleranz von Stichereignissen bieten.

Inwiefern IgG-AK eine Rolle beim Aufbau des frühen Schutzes durch die AIT spielen könnten, wurde auch von Michils et al. untersucht (Michils et al. 2000). Diese beschichteten eine Reaktionsplatte mit Allergenextrakt und verglichen anschließend das Bindungsverhalten von aufgereinigten IgG-AK aus Testseren, die vor AIT sowie 12 Stunden und 24 Stunden nach Erreichen der MD gewonnen wurden. Dabei wurden bereits 12 Stunden nach Beginn der Ultra Rush-AIT durchschnittlich 54 % mehr allergenspezifische IgG-AK gebunden als vor der Therapie. Vergleichbare Werte fanden sich bei Patienten, die seit mindestens zwei Jahren eine AIT erhielten. Die Autoren schlossen dar-

aus, dass in der Initialphase der Ultra Rush-AIT eine Veränderung der Spezifität von IgG-AK stattfinden könnte, die mit einer frühen Entstehung klinischer Toleranz einhergeht.

Mit der in der vorliegenden Arbeit gewählten Methode zur Erfassung solcher rein qualitativer Veränderungen der blockierenden AK konnte eine ähnlich frühe Steigerung der blockierenden Aktivität jedoch nicht bestätigt werden. Im ELIFAB zeigte sich parallel zum Anstieg allergenspezifischen IgG4s frühestens nach acht Tagen eine verstärkte Inhibition der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen. Dies entspricht dem zur Entwicklung einer effektiven AK-basierten Immunantwort nötigen Zeitraum von mindestens sieben Tagen (Hahn 2008).

Eine bereits früh innerhalb der Einleitungsphase einsetzende Toleranz gegenüber dem Allergen könnte Ergebnissen der Arbeitsgruppe Maintz et al. folgend auch auf einer AIT-induzierten Modifikation des Histaminstoffwechsels beruhen (Maintz et al. 2009). So konnte gezeigt werden, dass Histaminspiegel im Plasma während der Ultra Rush-Aufdosierungsphase relativ stabil bleiben und sich vorübergehend erhöhte Histaminkonzentrationen nur nach den jeweiligen Dosiserhöhungen ausbilden. Die Ursache dieser Regulation des Histaminstoffwechsels konnte auf eine Verminderung der Aktivität Histamin synthetisierender Enzyme zurückgeführt werden. Analog dazu erhöhte sich die Aktivität Histamin abbauender Enzyme.

6.2.2 Blockierende Aktivität vor, unter und nach AIT - klinische Auswirkungen

Mit der Hypothese einer AIT-induzierten qualitativen Veränderung der spezifischen humoralen Komponenten rückten blockierende AK erneut in den Fokus der Forschung. Unter den zahlreichen weiteren immunologischen Veränderungen unter AIT stellt die Messung der Effekte dieser AK möglicherweise eine Methode zur Erfassung des Ausmaßes des durch die Therapie gebildeten Schutzes dar. Voraussetzung dafür ist eine enge Korrelation der Messwerte mit klinischen Symptomen der Allergie.

Mit dem IgE-FAB Assay und dem IgE-blocking factor Assay konnten Verfahren etabliert werden, die eine Erfassung der qualitativen Veränderungen von blockierenden AK und ihren Effekten auf die IgE-Allergen-Komplex-Bildung und -bindung ermöglichen (Shamji et al. 2006, Shamji et al. 2012, Shamji et al. 2013, Wachholz et al. 2003). In der Folge befassten sich zahlreiche Studien unter Einsatz des IgE-FAB Assays mit der Ausbildung blockierender Effekte bei Pollenallergikern. Möbs et al. beobachteten bei Birkenpollenallergikern eine infolge der AIT signifikant steigende blockierende Aktivität in den untersuchten Patientenseren (Möbs et al. 2012). Im Nachbeobachtungszeitraum nach Ende der dreijährigen AIT zeigte sich hingegen ein stetiger Rückgang dieser Effekte.

Untersuchungen bei Lieschgraspollenallergikern stützen die Ergebnisse bezüglich dieser Veränderungen unter AIT. James et al. konnten zwei Jahre nach Verabreichen der ersten Allergeninjektion eine Steigerung blockierender Aktivität um teilweise mehr als 50 % gegenüber dem Ausgangswert messen (James et al. 2011). Und auch Shamji et al. beobachteten bereits 22 Wochen nach Beginn der Therapie eine Zunahme um mehr als 40 % (Shamji et al. 2012). In allen Untersuchungen entwickelte sich die blockierende Aktivität jeweils parallel zum Anstieg der Konzentration blockierender IgG4-AK in den Patientenseren.

Um die Veränderungen der blockierenden Effekte auch nach Ende der Therapie zu untersuchen, tauschten James et al. bei einem Teil der Studienpopulation nach zwei Jahren Behandlung das Allergen- gegen ein Placebo-Präparat. Dabei zeigte sich entgegen den Beobachtungen von Möbs et al. über einen weiteren Untersuchungszeitraum von zwei Jahren auch in der Placebo-Gruppe trotz ausgesetzter Allergeninjektionen ein unvermindertes Fortbestehen der blockierenden Aktivität. Gleichzeitig sank die allergenspezifische IgG4-Konzentration in dieser Gruppe nach Aussetzen der Allergeninjektionen fast bis auf Werte ab, die vor Beginn der Therapie ermittelt wurden. Die Autoren sahen in diesem Phänomen eine weitere Bestätigung der Hypothese, dass die AIT vor allem qualitative Veränderungen der blockierenden AK zur Folge hat und diese Veränderungen als potentieller Biomarker zur Erfolgskontrolle geeignet sein könnten.

Durch die Etablierung eines Bet v 1-spezifischen EliFAB konnte die Ausprägung blockierender Aktivität infolge der AIT bei Pollenallergikern innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden. Die Seren von zwei Birkenpollenallergikern zeigten vor Therapiebeginn im EliFAB jeweils nahezu keine blockierende Aktivität. Nach 36 Monaten Therapie fand sich eine Steigerung, die im Mittel eine Reduktion der Bindung von IgE-Allergen-Komplexen um mehr als 50 % des Ausgangswertes zur Folge hatte.

Inwiefern diese Veränderungen auch bei der Therapie von Hymenopterengiftallergikern auftreten, konnte an Kollektiven von Wespengiftallergikern vor, unter und nach Ende der Therapie überprüft werden. In diesem Fall wurden die in der Studienpopulation enthaltenen Bienengiftallergiker ausgeschlossen, da nicht alle drei Kollektive (vor/unter/nach AIT) ein vergleichbares Verhältnis von Bienen- zu Wespengiftallergikern aufwiesen.

Analog zu den Ergebnissen bei Pollenallergikern zeigten auch die Seren von Wespengiftallergikern vor Therapie nahezu keine blockierende Aktivität. Seren, die unter Therapie gewonnen wurden, hier zum Zeitpunkt der Stichprovokation durchschnittlich 16 Monate nach Beginn der Behandlung, wiesen dagegen eine deutlich erhöhte Aktivität blockierender AK auf. Anders als es die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um James et al.

für die ersten 2 Jahre nach Ende der AIT bei Pollenallergikern zeigten (James et al. 2011), waren diese Effekte bei den Wespengiftallergikern nach Therapieende allerdings nicht festzustellen. 5-12 Jahre nach AIT fand sich kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen vor Therapie. Zwar besteht an dieser Stelle eine Diskrepanz zwischen den jeweiligen Untersuchungszeiträumen nach Ende der Immuntherapie (zwei Jahre bei James et al. gegenüber durchschnittlich neun Jahren in der vorliegenden Arbeit), die Ergebnisse dieser Arbeit werden jedoch durch Daten einer Studie mit Bienengiftallergikern gestützt. Varga et al. beobachteten an ausschließlich bei Kindern erhobenen Daten, dass die AIT-induzierten blockierenden Effekte bereits zwei Jahre nach Therapieende auf Niveau der Messwerte vor Therapie absanken (Varga et al. 2009), also genau dem Zeitintervall, das dem Untersuchungszeitraum der Studie von James et al. bei Pollenallergikern entspricht.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass in dieser Arbeit die Messung blockierender Aktivität auf das jeweils häufigste Majorallergen in Bienen- bzw. Wespengift beschränkt wurde, sodass abweichende Messergebnisse bei der Verwendung anderer Allergene nicht ganz auszuschließen sind. Ca. 90 % der Wespengiftallergiker zeigen nach der Bestimmung allergenspezifischer IgE-Konzentrationen eine Sensibilisierung gegenüber Ves v 5 (Hofmann et al. 2011a, Hofmann et al. 2011b, Vos et al. 2013). Somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Wespengiftallergiker eine isolierte Sensibilisierung gegenüber einem anderen Majorallergen als Ves v 5 aufweist, zwar relativ gering. Konkret finden sich jedoch drei Patienten, auf die dies zutreffen könnte, in der „nach AIT“-Gruppe. Sie könnten vornehmlich eine Sensibilisierung gegenüber dem zweiten Majorallergen des Wespengifts, Ves v 1, aufweisen (die Einschätzung der klinisch relevanten Sensibilisierungen wurde dabei anhand allergenspezifischer IgE- und IgG4-Konzentrationen getroffen; Tabelle 7). Dieser Ansatz könnte jedoch lediglich für einzelne Extremwerte eine Erklärung bieten, verdeutlicht in Abbildung 18, in der mögliche primär Ves v 1-sensibilisierte Patienten hervorgehoben sind. Sie weisen jeweils einen gegenüber den anderen Wespengiftallergikern, die einen Feldstich erlitten hatten, wesentlich erhöhten Quotienten von Ves v 1-spezifischem zu Ves v 5-spezifischem IgE von 10, 52 und 80 auf.

An die Ergebnisse von Varga et al. (2009) anknüpfend könnte die Ursache der post-AIT beobachteten unterschiedlichen Verläufe blockierender Aktivität dieser Arbeit gegenüber der Studie von James et al. (2011) jedoch auch in Zusammenhang mit der zugrundeliegenden allergischen Erkrankung stehen. Während Pollenallergiker in der jährlich wiederkehrenden Pollensaison regelmäßig auch nach Therapieende mit dem die Erkrankung auslösenden Allergen konfrontiert werden, vermeiden Hymenoptergiftallergiker jedes weitere Stichereignis aus Angst vor dem Wiederauftreten einer sys-

temischen Reaktion. Die repetitive Stimulation durch das Allergen bei Pollenallergikern könnte jedoch eine regelmäßige Boosterung der allergenspezifischen blockierenden AK bewirken. Unterstützung findet diese These in den Ergebnissen von Untersuchungen mit saisonal gegenüber dem Allergen exponierten Imkern. So konnte gezeigt werden, dass mit der jährlich wiederkehrenden Imkersaison und damit einhergehenden Stichereignissen allergenspezifische IgG4-Konzentration und blockierende Aktivität zunehmen (Chliva et al. 2015, Müller 2005, Varga et al. 2013). Diese Effekte sind um so ausgeprägter, je kürzer das letzte Stichereignis zurückliegt (Chliva et al. 2015) und konnten auch bei in dieser Studie eingeschlossenen Imkern vor Beginn der AIT beobachtet werden (vgl. Kap. 5.2.2).

Epidemiologische Langzeitstudien an AIT-behandelten Hymenopterengiftallergikern legen jedoch nahe, dass der langfristige Verlauf der immunologischen Toleranz post-AIT differenzierter zu beurteilen ist. Von mehreren Autoren konnte gezeigt werden, dass auch bis zu zehn Jahre nach Therapieende bei 85-95 % der AIT-Behandelten nach wie vor ein Schutz vor einer systemischen Reaktion besteht – u.a. abhängig vom Anteil der Bienengiftallergiker im jeweiligen Studienkollektiv, da sich bei diesen geringere Erfolgsraten der AIT zeigen (vgl. Kap. 1.6; Golden et al. 2000, Golden et al. 2004, Lang und Hawranek 2006). Folglich ist blockierende Aktivität, da sie bei einer substantiellen Zahl der Patienten nach Ende der AIT wieder abnimmt, zwar als ein wichtiger, jedoch nicht als allein maßgeblicher Mechanismus der Protektion vor Stichreaktionen viele Jahre nach Therapieende zu sehen. Für einige Patienten könnten vielmehr auch andere immunologische Mechanismen für die Langzeitwirkung relevant sein.

Trotz des auch viele Jahre nach AIT hohen Schutzes vor systemischen Reaktionen, ist die Entwicklung nach Therapieende jedoch auch in Anbetracht ihrer Dynamik zu beurteilen. So zeigen die Erhebungen von Golden et al., dass das Risiko einer systemischen Reaktion zumindest bei einzelnen Patienten unmittelbar nach Ende der Therapie rasch zunimmt (2000). Bereits zwei Jahre post-AIT zeigten 8 % der erfolgreich Behandelten wiederum eine systemische Reaktion nach Stichprovokation oder Stichereignis. Diese Zahl stieg weiter an auf 9,5 % im dritten, 13 % im fünften und 16,2 % im zehnten Jahr nach Ende der Immuntherapie (Golden et al. 2000), sodass sich ein asymptotischer Verlauf abzeichnet. Dieser entspricht dem auch viele Jahre nach Therapieende ermittelten hohen Schutz vor systemischen Reaktionen von mehr als 80 %. Weitere Studien mit noch längeren Nachbeobachtungszeiträumen bis zu 12 Jahren (außer Adelmeyer 2017: bis zu 29 Jahre) zeigen vergleichbare Ergebnisse mit 80 bis 91 % vor einer systemischen Reaktion geschützten Patienten (Adelmeyer 2017, Karagol et al. 2015, Lerch et Müller 1998, Reisman 1993). Zwar beweist diese Zahl die hohe Effekti-

vität und Langzeitwirkung der AIT, gleichzeitig ist sie jedoch mit einem raschen Verlust der Therapieeffekte einer Subpopulation der Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre gleichzusetzen. Es bleibt zu untersuchen, ob die betreffenden Patienten auch eine besonders rasche Abnahme blockierender Aktivität aufweisen, oder, ob vielmehr andere Parameter für den langfristigen Erhalt der Toleranz (z.B. verringerter allergenspezifischer IgE/IgG4-Quotient) ausschlaggebend sind.

Unabhängig von diesen der Toleranz zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen, ist eine langfristige Effektivität der AIT insbesondere bei Hymenoptereingiftallergikern von entscheidender Bedeutung, da jedes Stichereignis mit dem Risiko einer potentiell lebensbedrohlichen Reaktion verbunden ist. Vor dem Hintergrund der bei einzelnen Patienten post-AIT raschen Zunahme des Risikos systemischer Stichreaktionen – einhergehend mit einer nach Therapie schwindenden blockierenden Aktivität – sowie der Hypothese einer Langzeitprotektion durch wiederkehrenden Allergenkontakt bei Pollenallergikern könnte das Konzept von Boosterinjektionen nach abgeschlossener Therapie erneute Aktualität erlangen. Unterstützung findet die Hypothese in einer direkten Gegenüberstellung der immunologischen Veränderungen bei nicht allergischen Imkern und Patienten nach AIT. So konnte beobachtet werden, dass Imker durch die saisonale Exposition gegenüber dem Allergen nicht nur die gleichen immunologischen Veränderungen wie unter AIT zeigen. Vielmehr führt die wiederkehrende Stimulation zu einer über das gesamte Jahr höheren Baseline allergenspezifischer IgG4-produzierender Plasmazellen verglichen mit Patienten nach AIT (Boonpiyathad et al. 2017).

Weitere Erkenntnisse zur Wirkung von Boosterinjektionen konnten vor allem durch die schrittweise Ausdehnung von Injektionsintervallen in der Erhaltungsphase der Therapie gesammelt werden. Gleich mehrere Studien zeigen eine insbesondere bei Wespengiftallergikern unveränderte Sicherheit und Effektivität der Immuntherapie bei einer Ausdehnung der monatlichen Injektionsintervalle auf bis zu drei Monate (Goldberg und Reisman 1988, Goldberg et al. 1994, Kochyut und Stevens 1994). Von diesen Ergebnissen ausgehend entscheiden sich einige Patienten aus Gründen der Lebensqualität nach der empfohlenen Therapiedauer von 3-5 Jahren für weitere vierteljährliche Injektionen der Maximaldosis.

Entgegen der anerkannten Erfolge der dreimonatigen Intervalle sind die Ergebnisse bezüglich einer Ausdehnung auf sechs Monate widersprüchlich. So zeigte sich in einer Untersuchung von Goldberg et al. insbesondere bei Bienengiftallergikern eine geringere Effektivität der halbjährlichen Erhaltungstherapie (Goldberg und Confino-Cohen 2007), während Baenkler et al. keine Unterlegenheit gegenüber den etablierten Therapieprotokollen finden konnten und die halbjährlichen Injektionen seither erfolgreich an-

wenden (Baenkler et al. 2005). Dieser Erfolg könnte jedoch auch auf den in dieser Studie hohen Anteil von Wespengiftallergikern zurückzuführen sein, da diese deutlich stärker von einer AIT profitieren (Müller et al. 1992). Es sind daher umfassendere Untersuchungen mit entsprechenden Kontrollkollektiven nötig, um abschließende Aussagen treffen zu können.

In der Folge wird eine dauerhafte Fortsetzung der Erhaltungstherapie, etwa mit längeren 3-monatigen Injektionsintervallen, bisher nur bei einer kleinen Patientengruppe mit individuell erhöhtem Risiko von obigen Autoren empfohlen. Auch weil sich nach abgeschlossener AIT im Falle eines erneuten Stichereignisses weniger schwere Reaktionen zeigen. In den meisten Fällen lassen sie sich einem niedrigeren Schweregrad nach der Klassifikation von Ring und Messmer zuordnen als vor der Therapie, in der Regel Grad 0 (übersteigerte Lokalreaktion) bzw. 1 (Baenkler et al. 2005, Golden et al. 2000, Lerch und Müller 1998). Somit könnten möglicherweise in erster Linie selektierte Risiko-Patienten von halbjährlichen Boosterinjektionen profitieren, die auf eine 5-jährige Erhaltungstherapie folgen. Bezüglich des Erfolgs einer solchen Kombination liegen bisher zwar keine klinischen Daten vor, jedoch lässt die durchschnittlich deutlich längere Erhaltungstherapie in den Untersuchungen von Baenkler et al. (2005) gegenüber dem Protokoll von Golden et al. (2000) erahnen, dass eine 5-jährige Erhaltungstherapie nach aktuell empfohlenen Standards eine wichtige Grundlage für den Erfolg anschließender Boosterinjektionen bei Risiko-Patienten darstellen könnte.

Bei der Identifikation von Risiko-Patienten für schwere Reaktionen konnten bisher mehrere Eigenschaften gefunden werden, die mit schweren systemischen Reaktionen nach Therapieende einhergehen. Hierzu gehören schwere anaphylaktische Reaktionen vor der Therapie (Keating et al. 1991, Reisman 1993), systemische Reaktionen während der Therapie (Golden et al. 1998, Müller et al. 1991), häufige Stichereignisse nach Therapie (Golden et al. 2000, Lerch und Müller 1998), eine klinisch relevante Sensibilisierung gegenüber Bienengift (Lerch und Müller 1998, Müller et al. 1992) sowie eine erhöhte Sensitivität basophiler Granulozyten, erhöhte Tryptase-Spiegel im Serum und eine Mastozytose (Haeberli et al. 2003, Kosnik et al. 2005, Nidoszytko et al. 2009, Ruëff et al. 2009). Ferner zeigt sich eine schlechtere Prognose im Fall eines anaphylaktischen Ereignisses bei gleichzeitig vorliegenden Herz- und Gefäßerkrankungen und im Alter (Müller 2007, Tunon-de-Lara et al. 1992, Greenberger et al. 2007). An dieser Stelle werfen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse die Frage auf, inwiefern auch die Messung der Effekte blockierender AK im Patientenserum zu einer genaueren Identifikation von Risiko-Patienten beitragen kann bzw. ob eine Korrelation zwischen gemessener blockierender Aktivität und den Auswirkungen von Stichereignissen besteht.

6.2.3 Blockierende Aktivität als Entscheidungsparameter für die Toleranz von Sticheignissen

Als einzige langfristig immunmodulatorische und damit kausale Therapie ist die AIT bei der Behandlung von Insektengiftallergien inzwischen unverzichtbar. 80 bis 90 % der Bienengiftallergiker und sogar 95 % der Wespengiftallergiker besitzen nach AIT einen Schutz vor erneuten systemischen Reaktionen (Müller 2003). Ermittelt wurden diese Daten durch kontrollierte Stichprovokationen bei therapierten Hymenopterengiftallergikern. Diese bisher einzige verfügbare Methode zur Überprüfung des Therapieerfolgs ist mit einem hohen Aufwand, der Gefahr einer schweren Anaphylaxie und dem Risiko der *de novo*-Sensibilisierung (Ruëff et al. 1996) verbunden.

Dementgegen ist es bei Pollenallergikern möglich, regelmäßige und differenzierte Aussagen über den klinischen Erfolg der AIT festzuhalten. Anhand von Symptom- und Medikationsscores kann die Entwicklung der Allergentoleranz während des jährlich wiederkehrenden Pollenflugs dokumentiert und objektiviert werden. Erste umfassende Untersuchungen bezüglich einer Korrelation von blockierender Aktivität und klinischem Erfolg der AIT liegen daher auch bei Studienpopulationen von Gräserpollenallergikern vor. So verglichen Shamji et al. den Zusammenhang von klinischen Erfolgsparametern und allergenspezifischen IgG4-AK-Konzentrationen bzw. blockierender Aktivität in Patientenseren im Verlauf der Therapie (Shamji et al. 2012). Dabei postulierten die Autoren, dass die Veränderungen der quantitativen IgG4-AK-Konzentrationen zu 13 % den Behandlungserfolg erklären konnten. Dementgegen boten die qualitativen Veränderungen der allergenspezifischen IgG4-AK eine Erklärung für bis zu 40 % des Behandlungserfolgs. Die Autoren schlossen daraus, dass die Erfassung der Effekte blockierender AK in Patientenseren im Gegensatz zu den AK-Konzentrationen geeigneter sein könnten, prognostische Aussagen über einen Therapieerfolg zu treffen.

Daran anknüpfend ermöglicht die vorliegende Arbeit eine erste Einschätzung der Korrelation von blockierender Aktivität und klinischem Erfolg bei Hymenopterengiftallergikern. Dabei lagen klinische Daten, die eine Beurteilung des Schutzes und damit einen Vergleich mit der zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen blockierenden Aktivität zulassen, von drei Zeitpunkten vor. Zunächst berichteten alle eingeschlossenen Patienten von einer systemischen Reaktion vor Beginn der Therapie, die zur Indikationsstellung einer AIT führte. Unter AIT wurde ferner die klinische Reaktionslage mit einer Stichprovokation geprüft. Zuletzt konnten bei weiteren Patienten auch die Folgen von Sticheignissen nach Therapieende dokumentiert werden.

Bei der Messung blockierender Aktivität als potentiell Parameter der Allergentoleranz zeigten sich starke Unterschiede in den vor Therapiebeginn gewonnenen Patientenserien. So konnte insbesondere bei den untersuchten Bienengiftallergikern eine bereits vor Therapie extrem hohe blockierende Aktivität gemessen werden. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei fast ausschließlich um Personen handelte, die als Imker tätig sind oder Imker in der unmittelbaren Nachbarschaft haben. Die Ursache für die bereits bestehende hohe blockierende Aktivität lässt sich folglich in der deutlich erhöhten und zeitlich nahen letzten Exposition gegenüber dem Allergen vermuten. Vorherige Studien konnten bereits die Verbindung von erhöhter Allergenexposition bei Imkern und deutlich gesteigerten Konzentrationen von blockierenden IgG-AK sowie damit einhergehender blockierender Aktivität aufzeigen (Chliva et al. 2015, Müller 2005, Varga et al. 2013). Diese ist um so ausgeprägter, je kürzer das Stichereignis zurückliegt. Trotzdem ist die im Rahmen wiederholter Stichereignisse erlangte blockierende Aktivität bei den beschriebenen Bienengiftallergikern nicht mit einer klinischen Toleranz gegenüber Bienengift verbunden. Die Bildung allergenspezifischer blockierender IgG-AK scheint folglich nicht den allein entscheidenden immunologischen Mechanismus der Toleranzinduktion unter AIT darzustellen.

Es konnte jedoch beobachtet werden, dass auch bei Patienten mit vor AIT extrem hoher blockierender Aktivität diese während der Ultra Rush-Einleitung gesteigert werden konnte. Die prozentuale (relative) Zunahme der Blockadekapazität entsprach dabei den Veränderungen bei Patienten, die vor Therapie keine oder wenig blockierende Aktivität aufwiesen. Die prozentuale Steigerung der blockierenden Aktivität unter Therapie könnte somit als immunologischer Parameter primär eine prognostische Aussagekraft für das initiale Ansprechen auf die AIT haben. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht überprüft werden, da die jeweiligen Kollektive „Wespengiftallergiker vor AIT“ und „Wespengiftallergiker unter AIT“ keine longitudinalen Verläufe derselben Patienten darstellen.

In Übereinstimmung mit der bekanntermaßen hohen Erfolgsrate der Bienen- bzw. Wespengift-spezifischen Immuntherapie konnte bei keiner der durchgeführten Stichprobenreaktionen eine systemische Reaktion beobachtet werden. Es traten lediglich leichte Lokalreaktionen auf, sodass die Behandlung mit der gleichen Erhaltungsdosis weitergeführt wurde. Die EliFAB-Messung zeigte analog zur entwickelten Allergentoleranz bei 18 von 20 Patienten eine hohe Aktivität blockierender AK. Die Bindung von IgE-Allergen-Komplexen durch CD23 wurde bei diesen 18 Patienten durchschnittlich um mehr als 81 % gegenüber der Positivkontrolle inhibiert.

Zum ersten Mal wurde hier das Ergebnis von Stichprovokationen in Relation zu der im allergenspezifischen EliFAB gemessenen blockierenden Aktivität gesetzt. Dabei zeigt sich eine hohe Korrelation blockierender Effekte und der klinischen Toleranz von Stichereignissen während der Therapie. Folglich könnte die Messung blockierender Aktivität zum immunologischen Monitoring des Therapieerfolgs innerhalb der Therapiezeit geeignet sein. Weitere detailliertere Untersuchungen von Stichprovokationsergebnissen und zum gleichen Zeitpunkt erfasster blockierender Aktivität sind zur Prüfung dieses Zusammenhangs jedoch unerlässlich. Insbesondere, da bei zwei der 20 Patienten trotz tolerierter Stichprovokation keine blockierende Aktivität nachgewiesen werden konnte. Dies könnte z.B. auch auf eine isolierte Sensibilisierung gegenüber einem anderen Majorallergen als Ves v 5 zurückzuführen sein, was jedoch nicht eindeutig aus den gemessenen allergenspezifischen IgE- bzw. IgG4-Konzentrationen hervorgeht. Folglich ist vor allem die Verwendung eines Messverfahrens, das alle relevanten Majorallergene umfasst, von hoher Bedeutung für zukünftige Studien. Insbesondere durch den Einschluss einer größeren Fallzahl könnte an dieser Stelle auch die Sensitivität und Spezifität der Messung blockierender Aktivität zur Vorhersage einer systemischen Reaktion im Kontext der Stichprovokation bestimmt werden. Aus einer sicheren Detektion von Therapieversagern ergäbe sich die Eignung des Verfahrens zum immunologischen Monitoring unter der Therapie und Stichprovokationen wären nicht länger indiziert. Aufgrund der Seltenheit von Therapieversagern scheint dafür jedoch nur eine multizentrische Studie geeignet.

In die Untersuchung von Patientenseren nach AIT wurden ausschließlich Personen einbezogen, die einen Feldstich 5-12 Jahre nach Therapieende erlebt hatten. Auf Basis der von den Patienten beschriebenen Symptome nach Stichereignis wurde die Höhe der blockierenden Aktivität von Patienten mit systemischer Reaktion der Höhe der blockierenden Aktivität von Patienten ohne systemischer Reaktion gegenübergestellt. Es zeigte sich dabei eine leicht höhere Ausprägung der Inhibition der Allergen-IgE-Bindung bei Patienten, die den Feldstich tolerierten.

Allerdings basieren die hier vorliegenden Daten zu Reaktionen nach Feldstichereignissen auf den subjektiven Beschreibungen der Patienten und können daher nicht mit dem Ergebnis einer im kontrollierten klinischen Umfeld durchgeführten Stichprovokation verglichen werden. So könnten beispielsweise in einem Fall auch psychogene kardiovaskuläre Reaktionen die beschriebenen Symptome erklären bzw. andererseits die Reaktion eines weiteren Patienten auf eine separate Sensibilisierung gegenüber einem unbekannten Insekt zurückzuführen sein (Tabelle 8). Zudem könnten mögliche gegenüber Ves v 1 klinisch relevant sensibilisierte Patienten die Ergebnisse beeinflussen, da

der hier verwendete EliFAB nur die blockierende Aktivität gegenüber Ves v 5 misst (Tabelle 7). Des Weiteren liegt für keinen Patienten im Kollektiv „Feldstich“ eine Aussage bezüglich des ursprünglichen klinischen Erfolgs der Therapie vor, da bei diesen keine kontrollierten Stichprovokationen unter AIT durchgeführt wurden. Infolge einer unter Therapie ausgelösten systemischen Reaktion in Form einer Stichprovokation können Therapieversager erkannt und die Allergendosis nachträglich gesteigert werden. Dies führt zu einer deutlichen Senkung der Rate an Therapieversagern (Ruëff et al. 2001). Möglicherweise finden sich in diesem Kollektiv also auch Patienten, die von vornherein Therapieversager waren. Vor allem ist aber die Studienpopulation zu klein, um statistisch sichere Aussagen treffen zu können. An dieser Stelle sind umfangreichere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv mit einem EliFAB nötig, in dem sämtliche für das entsprechende Insekt relevanten Majorallergene geprüft werden, um eine eindeutigere Aussage bezüglich der prognostischen Eigenschaften blockierender Aktivität bei Stichereignissen nach Therapie zu treffen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es bereits nach acht Tagen AIT zu einer deutlichen prozentualen Steigerung blockierender Aktivität infolge einer vermehrten Synthese allergenspezifischer IgG-AK kommt. Durchschnittlich neun Jahre nach Ende der Therapie sind diese Effekte bei der Mehrzahl der Untersuchten nicht nachweisbar. Es besteht kein signifikanter Unterschied zum Niveau blockierender Aktivität bei Patienten vor Therapie. Dementgegen zeigen klinische Studien einen auch viele Jahre nach AIT nach wie vor hohen Schutz vor einer systemischen Reaktion bei mehr als 80 % der Behandelten. Die Ausbildung blockierender Aktivität scheint daher zumindest für einen großen Teil der Patienten zwar einen wichtigen, aber nicht den allein entscheidenden immunologischen Mechanismus der Toleranz darzustellen. Allerdings verlieren diesen klinischen Daten folgend einzelne Patienten den erworbenen Schutz bereits kurz nach Therapieende. Da eine dauerhaft fortgeführte Immuntherapie mit einem anhaltenden Schutz assoziiert ist und die Ausdehnung von Injektionsintervallen auf drei, möglicherweise sogar bis zu sechs, Monate gleiche Sicherheit und Effektivität zu zeigen scheint, könnte für diese Risiko-Patienten das Konzept von Boosterinjektionen im Sinne einer ausgedehnten Erhaltungstherapie erneut erörtert werden. Neben der Prüfung bekannter Risikofaktoren könnte zudem die Messung blockierender Aktivität während einer AIT einen Selektionsparameter bei der Identifikation gefährdeter Patienten darstellen. Eine sichere Aussage bezüglich der Korrelation von blockierender Aktivität und klinischem Erfolg der Hymenopterengift-spezifischen Immuntherapie konnte allerdings innerhalb dieser Arbeit aufgrund einer zu geringen Patientenzahl

nicht getroffen werden und muss in zukünftigen möglichst multizentrischen Studien überprüft werden. Auf diese Weise könnten auch Daten von Patienten mit fehlender Toleranzinduktion durch AIT (also einer systemischen Reaktion nach Stichprovokation) und verlorener Toleranz nach AIT (also einer Anaphylaxie nach einem Feldstich) erhoben werden. Von großer Relevanz ist an dieser Stelle auch eine umfassendere EliFAB-Diagnostik mit weiteren Majorallergenen der Hymenopterengifte. Den Ergebnissen folgend stellt die Messung blockierender Aktivität jedoch den bisher besten immunologischen Surrogatparameter zur Bestimmung des Erfolgs der AIT dar.

Die ausgezeichnete Eignung des EliFAB Assays zur Erfassung blockierender Effekte in Patientenserum konnte in dieser Studie bestätigt und erstmals auch auf Allergene der Hymenopterengifte angewandt werden. Hohe Reproduzierbarkeit, geringe Fehleranfälligkeit durch die zellfreie ELISA-Methode und die Erhebung großer Datenmengen in kurzer Zeit empfehlen das Verfahren für zukünftige Untersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., S. O. Stapel, J. Schuurman and T. Rispens (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39(4): 469-477.
- Adelmeyer, J. (2017). Langzeituntersuchungen zum psychisch-emotionalen Empfinden von Bienen- und Wespengiftallergikern (Dissertation). Philipps-Universität Marburg: 34
- Akdis, M., K. Blaser and C. A. Akdis (2005). T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116(5): 961-968; quiz 969.
- Arbes, S. J., P. J. Gergen, L. Elliott and D. C. Zeldin (2005). Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol* 116(2): 377-383.
- Aust, W., G. Wichmann and A. Dietz (2010). Therapy control of specific hymenoptera venom allergy. *Laryngorhinootologie* 89(12): 725-728.
- Baenkler, H. W., S. Meusser-Storm and G. Eger (2005). Continuous immunotherapy for hymenoptera venom allergy using six month intervals. *Allergol Immunopathol (Madr)* 33(1): 7-14.
- Bellinghausen, I., G. Metz, A. H. Enk, S. Christmann, J. Knop and J. Saloga (1997). Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 27(5): 1131-1139.
- Bernstein, I. L., J. T. Li, D. I. Bernstein, R. Hamilton, S. L. Spector, R. Tan, S. Sicherer, D. B. Golden, D. A. Khan, R. A. Nicklas, J. M. Portnoy, J. Blessing-Moore, L. Cox, D. M. Lang, J. Oppenheimer, C. C. Randolph, D. E. Schuller, S. A. Tilles, D. V. Wallace, E. Levetin, R. Weber, A. t. a. I. American Academy of Allergy and A. t. a. I. American College of Allergy (2008). Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 100(3 Suppl 3): S1-148.
- Biló, B. M., F. Rueff, H. Mosbech, F. Bonifazi, J. N. Oude-Elberink and E. I. G. o. I. V. Hypersensitivity (2005). Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 60(11): 1339-1349.
- Bodtger, U., A. M. Ejrnaes, L. Hummelshoj, H. H. Jacobi, L. K. Poulsen and M. Svenson (2005). Is immunotherapy-induced birch-pollen-specific IgG4 a marker for decreased allergen-specific sensitivity? *Int Arch Allergy Immunol* 136(4): 340-346.

- Boonpiyathad, T., N. Meyer, M. Moniuszko, M. Sokolowska, A. Eljaszewicz, O. F. Wirz, M. M. Tomasiak-Lozowska, A. Bodzenta-Lukaszyk, K. Ruxrungtham und W. van de Veen (2017). High-dose bee venom exposure induces similar tolerogenic B-cell responses in allergic patients and healthy beekeepers. *Allergy* 2017; 72: 407–415.
- Brown, T. C. and M. S. Tankersley (2011). The sting of the honeybee: an allergic perspective. *Ann Allergy Asthma Immunol* 107(6): 463-470; quiz 471.
- Bucher, C., P. Korner and B. Wüthrich (2001). Allergy to bumblebee venom. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1(4): 361-365.
- Chliva, C., X. Aggelides, M. Makris, A. Katoulis, D. Rigopoulos and E. Tiligada (2015). Comparable profiles of serum histamine and IgG4 levels in allergic beekeepers. *Allergy* 70(4): 457-460.
- Coombs, R. R. A. and P. H. G. Gell (1975). Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications.
- de Graaf, D. C., M. Aerts, E. Danneels and B. Devreese (2009). Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics* 72(2): 145-154.
- Durham, S. R., S. M. Walker, E. M. Varga, M. R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S. J. Till, Q. A. Hamid and K. T. Nouri-Aria (1999). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341(7): 468-475.
- Eng, P. A., M. Borer-Reinhold, I. A. Heijnen and H. P. Gnehm (2006). Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy* 61(2): 198-201.
- Erzen, R., P. Korosec, M. Silar, E. Music and M. Kosnik (2009). Carbohydrate epitopes as a cause of cross-reactivity in patients allergic to Hymenoptera venom. *Wien Klin Wochenschr* 121(9-10): 349-352.
- Estes, D. M., A. Hirano, V. T. Heussler, D. A. Dobbelaere and W. C. Brown (1995). Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell Immunol* 163(2): 268-279.
- Ewan, P. W., J. Deighton, A. B. Wilson and P. J. Lachmann (1993). Venom-specific IgG antibodies in bee and wasp allergy: lack of correlation with protection from stings. *Clin Exp Allergy* 23(8): 647-660.
- Francis, J. N. (2008). The facilitated antigen binding (FAB) assay--a protocol to measure allergen-specific inhibitory antibody activity. *Methods Mol Med* 138: 255-261.

- Goldberg, A. and R. Confino-Cohen (2007). Effectiveness of maintenance bee venom immunotherapy administered at 6-month intervals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 99(4): 352-357.
- Goldberg, A., R. Confino-Cohen and Y. A. Mekori (1994). Deliberate bee sting challenge of patients receiving maintenance venom immunotherapy at 3-month intervals. *J Allergy Clin Immunol* 93(6): 997-1001.
- Goldberg, A. and R. E. Reisman (1988). Prolonged interval maintenance venom immunotherapy. *Ann Allergy* 61(3): 177-179.
- Goldberg, A., A. Yogev and R. Confino-Cohen (2011). Three days rush venom immunotherapy in bee allergy: safe, inexpensive and instantaneously effective. *Int Arch Allergy Immunol* 156(1): 90-98.
- Golden, D. B., A. Kagey-Sobotka and L. M. Lichtenstein (2000). Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 105(2 Pt 1): 385-390.
- Golden, D. B., A. Kagey-Sobotka, P. S. Norman, R. G. Hamilton and L. M. Lichtenstein (2004). Outcomes of allergy to insect stings in children, with and without venom immunotherapy. *N Engl J Med* 351(7): 668-674.
- Golden, D. B., K. A. Kwitrovich, A. Kagey-Sobotka and L. M. Lichtenstein (1998). Discontinuing venom immunotherapy: extended observations. *J Allergy Clin Immunol* 101(3): 298-305.
- Golden, D. B., J. Moffitt, R. A. Nicklas, T. Freeman, D. F. Graft, R. E. Reisman, J. M. Tracy, D. Bernstein, J. Blessing-Moore, L. Cox, D. A. Khan, D. M. Lang, J. Oppenheimer, J. M. Portnoy, C. Randolph, D. E. Schuller, S. L. Spector, S. A. Tilles, D. Wallace, J. T. F. o. P. Parameters, A. t. I. A. American Academy of Allergy, A. t. I. A. American College of Allergy and A. t. a. I. Joint Council of Allergy (2011). Stinging insect hypersensitivity: a practice parameter update 2011. *J Allergy Clin Immunol* 127(4): 852-854.e851-823.
- Greenberger, P. A., B. D. Rotskoff and B. Lifschultz (2007). Fatal anaphylaxis: postmortem findings and associated comorbid diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 98(3): 252-257.
- Haeberli, G., M. Brönnimann, T. Hunziker and U. Müller (2003). Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 33(9): 1216-1220.
- Hahn, H. und S. H. E. Kaufmann (2008). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* Springer Verlag: 99 ff.

- Hofmann, S. C., N. Pfender, S. Weckesser, S. Blank, J. Huss-Marp, E. Spillner and T. Jakob (2011a). Detection of IgE to recombinant Api m 1 and rVes v 5 is valuable but not sufficient to distinguish bee venom from wasp venom allergy. Reply. *J Allergy Clin Immunol* 128.
- Hofmann, S. C., N. Pfender, S. Weckesser, J. Huss-Marp and T. Jakob (2011b). Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 127(1): 265-267.
- Howarth, P. H. and K. Holmberg (1995). Allergic rhinitis: an increasing clinical problem. *Allergy* 50(23 Suppl): 4-5.
- Jacobsen, L., B. Niggemann, S. Dreborg, H. A. Ferdousi, S. Halken, A. Høst, A. Koivikko, L. A. Norberg, E. Valovirta, U. Wahn, C. Möller and T. P. i. group (2007). Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 62(8): 943-948.
- James, L. K., M. H. Shamji, S. M. Walker, D. R. Wilson, P. A. Wachholz, J. N. Francis, M. R. Jacobson, I. Kimber, S. J. Till and S. R. Durham (2011). Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 127(2): 509-516.e501-505.
- Jutel, M., W. J. Pichler, D. Skrbic, A. Urwyler, C. Dahinden and U. R. Müller (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154(8): 4187-4194.
- Kalogeromitros, D., M. Makris, I. Koti, C. Chliva, A. Mellios, G. Avgerinou and T. C. Theoharides (2010). A simple 3-day rush venom immunotherapy protocol: documentation of safety. *Allergol Immunopathol (Madr)* 38(2): 69-73.
- Karagol E., A. Bakirtas, O. Yilmaz, E. Topal, M. Arga, M.S. Demirsoy and I. Turktas (2015). Long-term follow-up of re-sting reactions in children with moderate to severe venom hypersensitivity. *Eur J Pediatr*. 174(7): 891-896.
- Kashyap, M., A. M. Thornton, S. K. Norton, B. Barnstein, M. Macey, J. Brenzovich, E. Shevach, W. J. Leonard and J. J. Ryan (2008). Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J Immunol* 180(4): 2039-2043.
- Keating, M. U., A. Kagey-Sobotka, R. G. Hamilton and J. W. Yunginger (1991). Clinical and immunologic follow-up of patients who stop venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 88(3 Pt 1): 339-348.

- King, T. P., G. Lu, M. Gonzalez, N. Qian and L. Soldatova (1996). Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 98(3): 588-600.
- Kisselgof, A. B. and H. C. Oettgen (1998). The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE. *Int Immunol* 10(9): 1377-1384.
- Kochuyt, A. M. and E. A. Stevens (1994). Safety and efficacy of a 12-week maintenance interval in patients treated with Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 24(1): 35-41.
- Kosnik, M., M. Silar, N. Bajrovic, E. Music and P. Korosec (2005). High sensitivity of basophils predicts side-effects in venom immunotherapy. *Allergy* 60(11): 1401-1406.
- Köhler, J., S. Blank, S. Müller, F. Bantleon, M. Frick, J. Huss-Marp, J. Lidholm, E. Spillner and T. Jakob (2014). Component resolution reveals additional major allergens in patients with honeybee venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 133(5): 1383-1389, 1389.e1381-1386.
- Lang, R. and T. Hawranek (2006). Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16(4): 224-231.
- Lantz, C. S., M. Yamaguchi, H. C. Oettgen, I. M. Katona, I. Miyajima, J. P. Kinet and S. J. Galli (1997). IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. *J Immunol* 158(6): 2517-2521.
- Larché, M., C. A. Akdis and R. Valenta (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6(10): 761-771.
- Lerch, E. and U. R. Müller (1998). Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol* 101(5): 606-612.
- Lessoof, M. H., A. K. Sobotka and L. M. Lichtenstein (1978). Effects of passive antibody in bee venom anaphylaxis. *Johns Hopkins Med J* 142(1): 1-7.
- Macfarlane, A. J., O. M. Kon, S. J. Smith, K. Zeibecoglou, L. N. Khan, L. T. Barata, A. R. McEuen, M. G. Buckley, A. F. Walls, Q. Meng, M. Humbert, N. C. Barnes, D. S. Robinson, S. Ying and A. B. Kay (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1): 99-107.
- Maintz, L., C. Bussmann, T. Bieber and N. Novak (2009). Contribution of histamine metabolism to tachyphylaxis during the buildup phase of rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 123(3): 701-703.

- Mamessier, E., J. Birnbaum, P. Dupuy, D. Vervloet and A. Magnan (2006). Ultra-rush venom immunotherapy induces differential T cell activation and regulatory patterns according to the severity of allergy. *Clin Exp Allergy* 36(6): 704-713.
- Michils, A., S. Baldassarre, C. Ledent, M. Mairesse, B. Gossart and J. Duchateau (2000). Early effect of ultrarush venom immunotherapy on the IgG antibody response. *Allergy* 55(5): 455-462.
- Möbs, C., H. Ipsen, L. Mayer, C. Slotosch, A. Petersen, P. A. Würtzen, M. Hertl and W. Pfützner (2012). Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 130(5): 1108-1116.e1106.
- Müller, U., E. Berchtold and A. Helbling (1991). Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol* 87(3): 702-709.
- Müller, U., A. Helbling and E. Berchtold (1992). Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 89(2): 529-535.
- Müller, U., A. Helbling and M. Bischof (1989). Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 44(6): 412-418.
- Müller, U. R. (2003). Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3(4): 299-303.
- Müller, U. R. (2005). Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5(4): 343-347.
- Müller, U. R. (2007). Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(4): 337-341.
- Niedoszytko, M., J. de Monchy, J. J. van Doormaal, E. Jassem and J. N. Oude Elberink (2009). Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy* 64(9): 1237-1245.
- Nies, J. H., C. Bär, G. Schlenvoigt, B. Fahlbusch, G. Zwacka and U. R. Markert (2002). IL-4 supplemented B-cell cultures of allergic children show reduced IgA and IgG production in response to additional stimulation with IL-10. *J Invest Allergol Clin Immunol* 12(2): 99-106.
- Pasaoglu, G., B. A. Sin and Z. Misirligil (2006). Rush hymenoptera venom immunotherapy is efficacious and safe. *J Invest Allergol Clin Immunol* 16(4): 232-238.
- Pfaar, O., C. Bachert, A. Bufe, R. Buhl, C. Ebner, P. Eng, F. Friedrichs, T. Fuchs, E. Hamelmann, D. Hartwig-Bade, T. Hering, I. Huttegger, K. Jung, L. Klimek, M.

- V. Kopp, H. Merk, U. Rabe, J. Saloga, P. Schmid-Grendelmeier, A. Schuster, N. Schwerk, H. Sitter, U. Umpfenbach, B. Wedi, S. Wöhr, M. Worm, J. Kleine-Tebbe, S. Kaul and A. Schwalfenberg (2014). Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (ÖGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int* 23(8): 282-319.
- Platts-Mills, T. A. (2001). The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164(8 Pt 2): S1-5.
- Poulsen, L. K. and L. Hummelshøj (2007). Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 39(6): 440-456.
- Przybilla, B. and F. Ruëff (2010). Hymenoptera venom allergy. *J Dtsch Dermatol Ges* 8(2): 114-127; quiz 128-130.
- Przybilla, B., F. Ruëff, A. Walker, H.-C. Räwer, W. Aberer, C. P. Bauer, D. Berdel, T. Biedermann, K. Brockow, J. Forster, T. Fuchs, E. Hamelmann, T. Jakob, R. Jarisch, H. F. Merk, U. Müller, H. Ott, W. Sitter, R. Urbanek, B. Wedi (2011). Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI). *Allergo J* 2011; 20: 318–39
- Raghavan, M. and P. J. Bjorkman (1996). Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220.

- Reisman, R. E. (1992). Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions. *J Allergy Clin Immunol* 90(3 Pt 1): 335-339.
- Reisman, R. E. (1993). Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 92(6): 831-836.
- Romagnani, S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112(3): 352-363.
- Ruëff, F., B. Przybilla, M. B. Biló, U. Müller, F. Scheipl, W. Aberer, J. Birnbaum, A. Bodzenta-Lukaszyk, F. Bonifazi, C. Bucher, P. Campi, U. Darsow, C. Egger, G. Haeberli, T. Hawranek, M. Körner, I. Kucharewicz, H. Küchenhoff, R. Lang, O. Quercia, N. Reider, M. Severino, M. Sticherling, G. J. Sturm and B. Wüthrich (2009). Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase-a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 124(5): 1047-1054.
- Ruëff, F., B. Przybilla, U. Müller and H. Mosbech (1996). The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 51(4): 216-225.
- Ruëff, F., A. Wenderoth and B. Przybilla (2001). Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. *J Allergy Clin Immunol* 108(6): 1027-1032.
- Schroeder, H. W. and L. Cavacini (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S41-52.
- Seismann, H., S. Blank, L. Cifuentes, I. Braren, R. Bredehorst, T. Grunwald, M. Ollert and E. Spillner (2010). Recombinant phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity. *Clin Mol Allergy* 8: 7.
- Shamji, M. H., J. N. Francis, P. A. Würtzen, K. Lund, S. R. Durham and S. J. Till (2013). Cell-free detection of allergen-IgE cross-linking with immobilized phase CD23: inhibition by blocking antibody responses after immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 132(4): 1003-1005.e1001-1004.
- Shamji, M. H., C. Ljørring, J. N. Francis, M. A. Calderon, M. Larché, I. Kimber, A. J. Frew, H. Ipsen, K. Lund, P. A. Würtzen and S. R. Durham (2012). Functional

- rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* 67(2): 217-226.
- Shamji, M. H., L. K. Wilcock, P. A. Wachholz, R. J. Dearman, I. Kimber, P. A. Wurtzen, M. Larché, S. R. Durham and J. N. Francis (2006). The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses. *J Immunol Methods* 317(1-2): 71-79.
- Spillner, E., S. Blank and T. Jakob (2014). Hymenoptera Allergens: From Venom to Venome. *Front Immunol* 5: 77.
- Strait, R. T., S. C. Morris and F. D. Finkelman (2006). IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *J Clin Invest* 116(3): 833-841.
- Straumann, F., C. Bucher and B. Wüthrich (2000). Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting ige antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom. *Int Arch Allergy Immunol* 123(3): 268-274.
- Sutterwala, F. S., G. J. Noel, P. Salgame and D. M. Mosser (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med* 188(1): 217-222.
- Tunon-de-Lara, J. M., P. Villanueva, M. Marcos and A. Taytard (1992). ACE inhibitors and anaphylactoid reactions during venom immunotherapy. *Lancet* 340(8824): 908.
- Valenta, R. (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol* 2(6): 446-453.
- van der Veen, M. J., R. van Ree, R. C. Aalberse, J. Akkerdaas, S. J. Koppelman, H. M. Jansen and J. S. van der Zee (1997). Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 100(3): 327-334.
- Varga, E. M., J. N. Francis, M. S. Zach, S. Klunker, W. Aberer and S. R. Durham (2009). Time course of serum inhibitory activity for facilitated allergen-IgE binding during bee venom immunotherapy in children. *Clin Exp Allergy* 39(9): 1353-1357.
- Varga, E. M., F. Kausar, W. Aberer, M. Zach, E. Eber, S. R. Durham and M. H. Shamji (2013). Tolerant beekeepers display venom-specific functional IgG4 antibodies in the absence of specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* 131(5): 1419-1421.

- Vidarsson, G., G. Dekkers and T. Rispens (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5: 520.
- Vos, B., J. Köhler, S. Müller, E. Stretz, F. Ruëff and T. Jakob (2013). Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to *Vespula* venom. *J Allergy Clin Immunol* 131(4): 1225-1227, 1227.e1221.
- Wachholz, P. A. and S. R. Durham (2004). Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(4): 313-318.
- Wachholz, P. A., N. K. Soni, S. J. Till and S. R. Durham (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 112(5): 915-922.
- Worm, M., O. Eckermann, S. Dölle, W. Aberer, K. Beyer, T. Hawranek, S. Hompes, A. Koehli, V. Mahler, K. Nemat, B. Niggemann, C. Pfohler, U. Rabe, A. Reissig, E. Rietschel, K. Scherer, R. Treudler and F. Ruëff (2014). Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4,000 cases from Germany, Austria and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int* 111(21) 367-375.
- Würtzen, P. A., G. Lund, K. Lund, M. Arvidsson, S. Rak and H. Ipsen (2008). A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy* 38(8): 1290-1301.
- Yamaguchi, M., C. S. Lantz, H. C. Oettgen, I. M. Katona, T. Fleming, I. Miyajima, J. P. Kinet and S. J. Galli (1997). IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 185(4): 663-672.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Wolfgang Pfützner für die Vergabe des Themas dieser Arbeit, die Einführung in ein interessantes und spannendes Forschungsfeld sowie die freundliche und motivierende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christian Möbs für die ausgezeichnete Betreuung. Seine stete Erreichbarkeit, Einsatz, Motivation und Unterstützung bei der Einarbeitung im Labor haben einen großen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken. Mein spezieller Dank geht an Yvonne und Robert, die mir, wann immer nötig, sofort und mit großem Engagement meine Fragen zu Labortechniken beantworteten.

Durch die Rekrutierung von Patienten haben vor allem Julia Pickert, Jan Adelmeyer und Annika Rudzio die Grundlage für diese Arbeit geschaffen. Vielen Dank dafür!

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Thilo Jakob von der Justus-Liebig-Universität Gießen für die schnelle Bereitstellung eines für die Etablierung des Assays unverzichtbaren potentiellen Indikatorserums und Prof. Dr. Edzard Spillner, Aarhus Universität, Aarhus, Dänemark, für die Herstellung von rekombinantem Ves v 5.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre stete Unterstützung und Geduld.

8.2 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren, Doktoren und Dozenten

In Marburg:

Adamkiewicz, Baum, Becker, Bien, Bücking, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dodel, Doll, Feuser, Geks, Hasilik, Hoenemann, Josephs, Kinscherf, Klose, Koolman, Köhler, König, Leinweber, Lill, Lohoff, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Patrascan, Pape-Meyer, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Ruchholz, Schäfer, Schütz, Sevinc, Steinfeldt, Steiniger, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Westermann, Wilhelm, Wißniowski, Wrocklage, Zemlin.

In Fulda:

Gille, Hellinger, Rüttger, Witzleb, Ziehe.

Inhaltliche Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Allergy 2015; Volume 70; Issue 6; Pages 715–719.

Experimental Dermatology 2015; Volume 24; Issue 3; Page E3

Allergo Journal 2014; Band 23; Ausgabe 1; Seite 66